

**Die Auswirkungen von Hyperglykämie auf die Angiogenese am
Zellkulturmodell mit humanen umbilicalen Endothelzellen**

**Antagonisierung durch β_2 -Adrenozeptorstimulation und
Proteinkinase C-Inhibition zur Prävention der endothelialen Dysfunktion**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

Eingereicht von:

Johanna Katharina Hosu (geb. Mast)
Geboren am 24.02.1991 in Berlin

Angefertigt an:

Klinik für Herzchirurgie
Herzzentrum Leipzig, Universität Leipzig
Klinikdirektor: Prof. Michael A. Borger, MD PhD
Strümpellstraße 39, 04289 Leipzig

Betreuer:

Prof. Michael A. Borger, MD PhD

Ko-Betreuer:

Prof. Dr. med Stefan Dhein

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 18.12.2018

Bibliographische Beschreibung:

Auswirkung der Hyperglykämie auf die Angiogenese im Diabetesmodell. 102 Seiten.
Medizinische Fakultät der Universität Leipzig, Klinik für Herzchirurgie, Dissertation, 2018.

Johanna Katharina Hosu

Titel:

Die Auswirkungen von Hyperglykämie auf die Angiogenese am Zellkulturmodell mit humanen umbilicalen Endothelzellen.

Antagonisierung durch β_2 -Adrenozeptorstimulation und Proteinkinase C-Inhibition zur Prävention der endothelialen Dysfunktion.

Universität Leipzig, Dissertation

102 S., 197 Lit., 15 Abb., 3 Tab.

Referat:

Dysfunktionale Angiogenese spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung mikrovaskulärer Spätkomplikationen bei Diabetespatienten.

Ziel der Dissertation ist es, die Auswirkungen der chronischen Hyperglykämie auf die Angiogenese im *in vitro* Diabetesmodell, sowie den Einfluss einer Proteinkinase C-Inhibition und β_2 -Adrenozeptorstimulation zu untersuchen.

Die Experimente wurden an humanen umbilicalen Endothelzellen im Angiogeneseassay durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abkürzungsverzeichnis.....	3
1. Einführung.....	6
1.1. Diabetes mellitus	6
1.2. Endothel und Angiogenese.....	7
1.3. Diabetes mellitus und Endotheliale Dysfunktion	10
1.4. Therapeutische Interventionsmöglichkeiten und Forschungsbedarf	11
2. Fragestellung.....	14
3. Material.....	15
3.1. Zellkultur	15
3.2. Angiogeneseassay	21
3.3. Allgemeine Chemikalien	24
3.4. Herstellung der einzelnen Lösungen	25
3.4.1. Allgemeine Lösungen.....	25
3.4.2. Zellkultur	26
3.4.3. Angiogeneseassay.....	28
3.5. Software.....	29
4. Methoden.....	30
4.1. Ethikerklärung	30
4.2. Versuchsaufbau	30
4.3. Zellkultur	33
4.3.1. Gelatinebeschichtung von Zellkulturgefäßen	33
4.3.2. Präparation von Endothelzellen.....	33
4.3.3. Kultivierung und Passage der Endothelzellen	34
4.4. Angiogenese Assay (3D-Kultur)	35
4.4.1. Versuchsprotokoll Tag 1	35
4.4.2. Matrigelherstellung.....	36
4.4.3. FITC-Lektin-Färbung	37
4.4.4. Versuchsprotokoll Tag 2	38
4.4.5. DAPI-Färbung	38
4.4.6. Auswertung Angiogenese Assay	39
4.4.7. Eindeckelung	40
4.5. Statistische Analyse und Textverarbeitung	40
5. Ergebnisse	41

5.1.	Menschliche venöse Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVECs) in der Zellkultur	41
5.2.	Der Einfluss von Hyperglykämie (D-Glukose), 3- <i>O</i> -Methyl-D-Glukose und L-Glukose auf die Angiogenese	42
5.3.	Der Effekt von Salbutamol unter normoglykämischen Bedingungen auf die Angiogenese .	46
5.4.	Der Effekt von Salbutamol und Bisindolylmaleimid 1 unter hyperglykämischen Bedingungen auf die Angiogenese	49
6.	Diskussion der verwendeten Methoden	54
6.1.	Zellkultur	54
6.2.	Angiogeneseassay	56
6.3.	Simulation des Diabetes mellitus im Zellkulturmodell	58
7.	Diskussion der Ergebnisse	59
7.1.	Effekte der Hyperglykämie auf die Angiogenese	59
7.2.	Endotheliale Dysfunktion, verminderte NO-Bioverfügbarkeit und eingeschränkte Angiogenese	60
7.3.	Pathomechanismen der Hyperglykämie induzierten endothelialen Dysfunktion – Akkumulation reaktiver Sauerstoffverbindungen	61
7.4.	Hyperglykämie induzierte metabolische Signalwege	62
7.4.1.	Steigerung des Polyolweges	63
7.4.2.	Steigerung des Hexosaminweges	63
7.4.3.	Akkumulation von AGE's (Advanced glycation end products)	64
7.4.4.	Aktivierung des PKC-Signalweges	65
7.5.	Die Effekte von Pharmaka auf die Angiogenese von unter Hyperglykämie kultivierten HUVEC – PKC-Inhibition durch BIM	69
7.6.	Die PKC-Inhibition als therapeutischer Angriffspunkt	70
7.6.1.	Der Effekt der PKC-Inhibition auf die endotheliale Funktion in Diabetesmodellen	70
7.6.2.	Der Effekt der PKC-Inhibition auf die Angiogenese in Diabetesmodellen	70
7.6.3.	Der Effekt der PKC-Inhibition auf mikrovaskuläre Komplikationen des Diabetes in klinischen Studien	71
7.6.4.	Ein Ausblick	73
7.7.	Die Effekte von Pharmaka auf unter Hyperglykämie kultivierte HUVEC – Der Effekt der Behandlung mit Salbutamol	74
8.	Zusammenfassung der Arbeit	77
9.	Literaturverzeichnis	79
10.	Abbildungsverzeichnis	96
11.	Tabellenverzeichnis	97
	Selbstständigkeitserklärung	98
	Danksagung	99
	Curriculum vitae	100

Abkürzungsverzeichnis

ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
AGE	Advanced glycation endproduct
AIF	Apoptosis inducing factor
Akt	Proteinkinase B
ANG	Angiopoietin
ATP	Adenosintriphosphat
BAECs	Bovine aortic endothelial cells
bFGF	basic fibroblast growth factor
BH ₂	Dihydrobiopterin
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BIM	Bisindolylmaleimid
cAK	AMP aktivierte Proteinkinasen
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CAT-1	kationischer Aminosäure-Transporter Typ 1
cGMP	cyclisches Guanosin-3',5'-Monophosphat
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4',6-Diamidine-2'-phenylindole
DCCT	Diabetes Control and Complications Trial
DDAH	Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase
DPN	Diabetische periphere Neuropathie
ECs	Endothelial cells
eGFR	geschätzte Glomeruläre Filtrationsrate
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
eNOS	endothelial Nitric Oxide Synthase
ET-1	Endothelin-1
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulphid
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

HbA1c	Glykiertes Hämoglobin A1
HCl	Hydrogenchlorid
HIF-1	Hypoxia inducing factor 1
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
MG	Molekulargewicht
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MW	Arithmetisches Mittel
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	Reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NADPH	Reduziertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NO	Stickstoffmonoxid (Nitric Oxide)
NOS	Nitric Oxide Synthase
NOX	NAD(P)H-abhängige Oxidase
NTSS-6	Neuropathy Total Symptom Score-6
O-Glc-NAc	N-Acetyl-Glucosamin
OGT	O-Glc-NAc-Transferase
OMD	3- <i>O</i> -Methyl-D-Glukose
P	Passage
PAEC	Porcine aortic endothelial cells
PBS	Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PDGF	Platelet derived growth factor
PDGFR	Receptor of Platelet derived growth factor
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PMA	Phorbolmyristic acid
PP1	Proteinphosphatase Typ 1
PP2A	Proteinphosphatase Typ 2a
RAGE	Receptor of AGE's
RBX	Ruboxistaurin
ROS	Reactive oxygen species

SEM	Standard error of the mean
SkBF	Skin Microvascular Blood Flow
SMCs	Smooth muscle cells
TGF	Transforming growth factor
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
U	Unit (Einheit)
UDP-GlcNAc	Uridin-5-diphospho-N-acetylglucosamin
UKPDS	United Kingdom Prospective Diabetes Study
VDT	Vibrationsdetektionsschwellenwert
VE-Cadherin	Vascular endothelial-Cadherin

1. Einführung

1.1. Diabetes mellitus

Diabetes ist eine folgenreiche, chronische und progrediente Erkrankung, welche durch erhöhte Blutglukosekonzentrationen (Nüchternplasmaglukose ≥ 7 mmol/l) charakterisiert ist. Sie tritt ein, wenn entweder wie beim Diabetes mellitus Typ 1 das Pankreas nicht genügend Insulin produziert und Insulininjektionen für das Überleben nötig sind oder wenn wie beim Diabetes mellitus Typ 2 der Körper das produzierte Insulin im Sinne einer Insulinresistenz nicht effektiv nutzen kann (Alberti u. a. 1998).

Diabetes mellitus ist eng verknüpft mit dem Metabolischen Syndrom – ein kardiovaskuläres Risikocluster bestehend aus stammbetonter Adipositas und zusätzlichen Faktoren wie Dyslipoproteinämie, Hypertonie und Glukosetoleranzstörung beziehungsweise Diabetes mellitus Typ 2 (Grundy u. a. 2005).

Die Mehrheit der Patienten leidet unter Diabetes mellitus Typ 2 (Alberti u. a. 1998). Während dieser früher als eine Erkrankung des mittleren bis höheren Erwachsenenalters bekannt war, sind heutzutage zunehmend auch junge Erwachsene und Kinder betroffen (Reinehr 2013).

Mit stetiger Zunahme der globalen Prävalenz in den letzten Jahren, ist Diabetes zu einem schwerwiegenden Problem mit einem bedeutenden ökonomischen Verlust für das öffentliche Gesundheitswesen nationaler Volkswirtschaften sowie Diabetespatienten selbst und ihren Familien geworden. Dies ist sowohl durch direkte medizinische Kosten, als auch durch indirekte Kosten wie dem gesundheitlichen Verlust der Arbeitsstelle und demzufolge einem Verlust von Löhnen bedingt (Seuring u. a. 2015).

Die Diabetesprävalenz hat sich global betrachtet seit 1980 fast verdoppelt, mit einem Anstieg von 4,7 % auf 8,5 % im Jahr 2014 in der erwachsenen Bevölkerung (über 18 Jahre). Das entspricht 422 Mio Menschen mit Diabetes weltweit (Zhou u. a. 2016). Damit verbunden ist auch ein Anstieg assoziierter Risikofaktoren wie Präadipositas und Adipositas (Di Cesare u. a. 2016).

Interessant ist auch zu beobachten, dass die Diabetesprävalenz im vergangenen Jahrzehnt schneller in den Ländern mit niedrigem und mittlerem Einkommen zugenommen hat, als in solchen mit hohem Einkommen (Zhou u. a. 2016).

Im Jahr 2012 weltweit direkt durch Diabetes verursachte Todesfälle beziffern sich auf 1,5 Mio. Hinzu kommen nicht zu unterschätzende 2,2 Mio Todesfälle verursacht durch pathologisch erhöhte Blutzuckerwerte und eine dadurch bedingte Steigerung kardiovaskulärer Risiken und chronischer Niereninsuffizienz (World Health Organization 2016).

Dabei führen alle Typen des Diabetes zu zahlreichen gesundheitlichen Komplikationen und erhöhen das Risiko verfrüht zu versterben. Eine der Ursachen ist die starke Assoziation zu kardiovaskulären Erkrankungen wie Koronarer Herzkrankheit oder Schlaganfall: Erwachsene Diabetespatienten haben eine zwei- bis dreifach erhöhte Rate an kardiovaskulären Erkrankungen als Erwachsene ohne Diabetes (Sarwar u. a. 2010).

Weitere mögliche Komplikationen aus dem mikrovaskulären Formenkreis beinhalten diabetische Nephropathie (Tuttle u. a. 2014), diabetische Retinopathie (Yau u. a. 2012) und diabetische Neuropathie (Harris u. a. 1993), Extremitätenamputationen durch infizierte, nicht-heilende Fußulcera (Moxey u. a. 2011), sowie Schwangerschaftskomplikationen (Wendland u. a. 2012). Desweiteren wurde eine verminderte angiogenetische Antwort auf myokardiale Ischämie angiographisch (Abaci u. a. 1999) und in Autopsiestudien gezeigt (Yarom u. a. 1992).

1.2. Endothel und Angiogenese

Bei Endothelzellen handelt es sich um Epithelzellen. Man findet sie in allen Gefäßen des Herz-Kreislauf-Systems. Sie kleiden die innere Gefäßwand (Intima) als einzellige Schicht, dem Endothel, aus. Das Endothel bildet eine semipermeable Grenzschrift, welche das Austreten von übermäßiger Plasmaflüssigkeit durch die einzellige Schicht, dem Monolayer, verhindert und die selektive Zufuhr von Nährstoffen und Hormonen zu den darunterliegenden Gefäßen reguliert. Das Endothel trägt maßgeblich zur vaskulären Homöostase durch die Freisetzung von Mediatoren mit einem weiten Spektrum an Eigenschaften bei: Vasodilatation/Vasokonstriktion, Hämostase/Fibrinolyse, Permeabilität/Adhäsion und Wachstum/Differenzierung (Potenza 2009).

Eine der endothelialen Funktionen ist die Angiogenese.

Angiogenese trägt zu einem großen Spektrum an physiologischen und pathologischen Gegebenheiten bei. Angiogenese ist notwendig um wachsendes Gewebe, wie beispielsweise bei der embryonalen Entwicklung oder Wundheilung, mit einem ausreichenden Blutfluss und einer adequaten Oxygenierung zu versorgen. Zahlreiche der Langzeitkomplikationen des Diabetes mellitus sind durch Vaskulopathien im Sinne anormaler Angiogenese charakterisiert. Übermäßige Angiogenese spielt eine Rolle bei diabetischer Retinopathie und Nephropathie, während gehemmte Angiogenese zu beeinträchtigter Wundheilung, verminderter koronarer Kollateralgefäßbildung, embryonalen Vaskulopathien bei Schwangerschaftskomplikationen durch maternalen Diabetes und Transplantatabstoßungsreaktionen bei Diabetespatienten führt.

Darüberhinaus ist auch die diabetische Neuropathie mit einem reduzierten nutritiven Blutfluss die Folge von Diabetes (Martin u. a. 2003).

Im Gegensatz zur Vaskulogenese, der de novo Entstehung von Gefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen (Swift & Weinstein 2009), kennzeichnet die Angiogenese die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits Bestehenden. Dadurch wird die Expansion eines Gefäßnetzwerkes ermöglicht (Risau 1997).

Physiologische Angiogenese kann zudem in Bildung eines neuen Gefäßes durch Aussprossung oder durch nicht-aussprossende Angiogenese, genannt Intussuszeption, unterschieden werden (Ribatti 2006). Bei Letzterer können sich vorbestehende Blutgefäße aufsplitten, um Tochtergefäße zu bilden (De Spiegelaere u. a. 2012).

Als die 4 Hauptereignisse der Angiogenese können die angiogenetische Sprossung, Lumenbildung, Anastomosenbildung, sowie Remodellierungs-/ Stabilisierungsphase betrachtet werden (Potente u. a. 2011):

Im Ruhezustand formen Endothelzellen ein Monolayer von sogenannten Phalanxzellen (Mazzone u. a. 2009), inaktivierte Endothelzellen, welche durch Zell-Adhäsionsmoleküle wie VE-Cadherin und Claudine untereinander verbunden sind. Endothelzellen werden von Perizyten umkleidet, welche die endotheliale Zellproliferation unterdrücken und zusammen mit den Phalanxzellen im Ruhezustand eine gemeinsame Basalmembran bilden (Armulika & Betsholtz 2009).

Nimmt ein ruhendes Gefäß ein proangiogenetisches Signal wie Vascular endothelial growth factor (VEGF) wahr, trennen sich zuerst die Perizyten als Antwort auf Angiopoietin-2 (ANG-2) von der Gefäßwand, einem proangiogenetischen Wachstumsfaktor, der von den Endothelzellen zur schnellen Freisetzung gespeichert wird (Augustin u. a. 2009). Für den Beginn der Aussprossung müssen die Endothelzellen herausgelöst werden, ein Prozess, welcher den proteolytischen Abbau der Basalmembran durch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) erfordert. MMPs setzen zudem proangiogenetische Wachstumsfaktoren frei, welche in die Matrix abgesondert werden (Arroyo & Iruela-Arispe 2010).

Um ein perfundiertes Gefäß zu bilden und zu verhindern, dass die Endothelzellen *en masse* in Richtung des angiogenetischen Signals migrieren, nehmen die Endothelzellen verschiedene Funktionszustände ein. Dabei ist das sogenannte *tip-stalk-cell* Konzept von besonderer Bedeutung. Beide Zellzustände stellen aktivierte Endothelzellen dar, im Gegensatz zu den ruhenden und nicht proliferierenden Phalanxzellen. Entscheidender Signalweg bei der Spezifikation in *tip cell* oder *stalk cell* ist der Notch-Signalweg (Lewis 1998). Die polarisierte *tip cell* dient dabei als Führungszelle, welche mittels aktinhaltiger Filopodien mit VEGF-

Rezeptoren Führungs-Reize aus der Umgebung registrieren kann, um so zu einer gerichteten Aussprossung des entstehenden Blutgefäßes zu führen. Die Nachbarzellen der *tip cells* übernehmen unterstützende Funktionen als sogenannte *stalk cells* (Stängelzellen), welche proliferieren, um den Stängel zu verlängern und ein Lumen aufzubauen (Gerhardt u. a. 2003). Die Präsenz von VEGF aktiviert das Endothel existierender Blutgefäße über den VEGFR2-Rezeptor (Ferrara 2009). Über die VEGF/Notch-Signaltransduktion wird eine begrenzte Anzahl von *tip cells* ausgewählt, wobei die direkt benachbarten Endothelzellen durch sogenannte laterale Inhibition in der Ausbildung des *tip cell*-Phänotyps gehindert werden, wohingegen der lumenbildende *stalk cell*-Phänotyp akquiriert wird (Hellström u. a. 2007; Leslie u. a. 2007; Suchting u. a. 2007).

Wenn *tip cells* zweier wachsender Sprosse mit ihren Filopodien aufeinandertreffen, werden neue Zell-Zell-Verbindungen, sogenannte adhesion junctions durch VE-Cadherin (Almagro u. a. 2010), etabliert und die Sprosse über Anastomose fusioniert (Bentley u. a. 2009).

Nach der Bildung neuer Verbindungen innerhalb des Gefäßnetzwerkes kommt es zur wichtigen Remodellierungs- und Stabilisierungsphase.

Ein wichtiger Faktor in der Remodellierungsphase ist Sauerstoff. Dabei induzieren erhöhte Sauerstoffkonzentrationen die Rückbildung vaskulärer Zweige, um die vaskuläre Dichte an das Gewebssauerstoffangebot anzupassen (Claxton & Fruttiger 2005).

Hämodynamische Kräfte wie der Blutfluss, sogenannter shear stress, fördert zusätzlich die Gefäßstabilisierung, während ein Fehlen der Gefäßperfusion eher eine Regression der neu gebildeten Gefäße bewirkt (Chen u. a. 2012).

Endothelzellen nehmen während der Gefäßstabilisierung ihr ruhendes Phalanxstadium wieder ein und Signale wie platelet-derived growth factor B (PDGF-B), Angiopoietin-1 (ANG-1), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) und Notch-Signalkomponenten verursachen eine Rekrutierung von Perizyten, welche die Endothelzellen wieder umkleiden (Jain 2003; Scheinet u. a. 2007). Die Rekrutierung von Perizyten verhindert die Regression der neu geformten Blutgefäße durch die Lieferung vaskulärer Stabilisationsfaktoren wie tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) und Angiopoietin-1 (ANG-1) (Saunders u. a. 2006; Sundberg C u. a. 2002).

1.3. Diabetes mellitus und Endotheliale Dysfunktion

Endotheliale Dysfunktion ist einer der entscheidenden Faktoren in der Ätiologie kardiovaskulärer Erkrankungen und diabetischer Komplikationen wie der Retinopathie, Nephropathie, Neuropathie und beeinträchtigter Wundheilung (Sheetz & King 2002).

Der Begriff der endothelialen Dysfunktion bezieht sich auf einen Zustand, in welchem das Endothel seine physiologischen Eigenschaften verliert und zu einem vasokonstriktorischem (Park u. a. 2000) und proinflammatorischen Zustand (Collier u. a. 2008) mit einer gestörten angiogenetischen Kompetenz und verminderter proliferativer und migratorischer Kapazität (Lizotte u. a. 2013), sowie gestörter Barrierefunktion des Gefäßendothels (Hempel u. a. 1997) wechselt.

Endothelzellen bilden Stickstoffmonoxid aus der Aminosäure L-Arginin durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS oder NOS 3) (Palmer u. a. 1988).

Das frei diffusionsfähige NO aktiviert in der darunterliegenden glatten Gefäßmuskulatur lösliche Guanylylcyclasen, sodass es zur Bildung von cyclischem Guanosin-3',5'-Monophosphat (cGMP) kommt. Die Folge ist eine Vasodilatation der glatten Gefäßmuskulatur durch die Aktivierung cGMP-abhängiger Proteinkinasen (Ignarro u. a. 1987; Palmer u. a. 1987).

Hope u. a. entdeckten 1991, dass die eNOS die NADPH-Diaphorase als Coenzym besitzt (Hope u. a. 1991).

Kabat u. a. konnten zeigen, dass porcine aortale Endothelzellen (PAEC) unter Hyperglykämie eine signifikant geringere NADPH-Diaphoraseaktivität und eine niedrigere NO-Liberation zeigen (Kabat u. a. 2004; Kabat & Dhein 2006).

Eine erniedrigte NO-Bioverfügbarkeit ist eines der wichtigsten Kennzeichen der endothelialen Dysfunktion (Witting u. a. 2007).

Die Abnahme der NO-Bioaktivität kann aus einer verminderten Proteinexpression der eNOS (Ding u. a. 2000), einem verminderten oder insuffizienten Anteil von eNOS-Substraten und/oder Kofaktoren (Vásquez-Vivar u. a. 1998a); einer beeinträchtigten eNOS-Aktivierung (Ingrid Fleming u. a. 2001; Du u. a. 2001) oder einem erhöhten NO-Abbau (Rubanyi & Vanhoutte 1986) resultieren. Letzteres ist vor allem durch reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) bedingt, welche mit NO Peroxynitrite bilden, starke Oxidantien, die die Struktur und Funktion zahlreicher zellulärer Komponenten verändern (Koppenol u. a. 1992).

Hyperglykämie ist ein allgemeines Merkmal des Typ 1 Diabetes und mangelnder glykämischer Kontrolle beim Typ 2 Diabetes. Erhöhter oxidativer Stress scheint die erste Veränderung zu sein, die zahlreiche andere triggert (Duckworth 2001; Powell u. a. 2001). Hyperglykämie induziert oxidativen Stress durch erhöhte Superoxidanionenbildung durch die mitochondriale

Elektronentransportkette und durch eine Proteinkinase C (PKC) bedingte Aktivierung von NAD(P)H-abhängigen Oxidasen (Inoguchi u. a. 2000). Die übermäßige Superoxidanionenbildung unter Hyperglykämie führt zu einer erhöhten Bildung von Peroxynitriten, welche dann mit dem eNOS-Kofaktor Tetrahydrobiopterin (BH₄) reagieren, was den BH₄-Mangel verstärkt (Milstien & Katusic 1999). Unter BH₄-Substratmangel wird die eNOS entkoppelt und überführt die Elektronen zu molekularem Sauerstoff statt auf L-Arginin, sodass vielmehr Superoxide anstatt von NO produziert werden (Vásquez-Vivar u. a. 1998a; Kuzkaya u. a. 2003).

Unabhängig vom mitochondrialen Metabolismus führt chronische Hyperglykämie zu einem Rückstau von Glykolysevorstufen und einer Hochregulation von vier großen Shuntsignalwegen: Polyolweg, Hexosaminweg, Akkumulation von Advanced Glycation end products und insbesondere einer Diacylglycerin (DAG) abhängigen Aktivierung der klassischen Proteinkinase C-Isoformen α , β I/II und γ (Nishikawa u. a. 2000; Brownlee 2001; He & King 2005). Die PKC-Aktivitätssteigerung senkt wiederum die eNOS-Aktivität und vermindert dadurch die NO-Produktion der Zellen (Ken-ichi Hirata, 1995). Letztendlich werden die PKC-Isoformen zusätzlich auch durch Oxidantien und mitochondriale Superoxide selbst vermehrt aktiviert (Konishi u. a. 1997; Nishikawa u. a. 2000), sodass ein sich selbst verstärkender Teufelskreis entsteht.

1.4. Therapeutische Interventionsmöglichkeiten und Forschungsbedarf

Diabetes mellitus Typ 2 und den Komplikationen aller Diabetestypen kann wirksam vorgebeugt werden durch Ausschaltung von Risikofaktoren mittels ausreichender Bewegung, gesunder Ernährung (WHO 2003; Ley u. a. 2014), Nikotinkarenz (Willi u. a. 2007) und Kontrolle von Blutzucker und Lipiden (Forouzanfar u. a. 2015).

Allerdings bleibt der Diabetes mellitus Typ 2 durch das Fehlen von Frühsymptomen oft für viele Jahre unentdeckt. Daher ist das Erkrankungsstadium zum Diagnosezeitpunkt bei den meisten Patienten schon fortgeschritten im Sinne von vaskulären Komplikationen. Schätzungen über undiagnostizierten Diabetes mellitus aus dem Jahre 2013 beziffern sich global betrachtet auf 45,8 % bzw. 174,8 Mio undiagnostizierte Diabetesfälle bei Erwachsenen weltweit. Wobei sich 83,8 % aller Fälle von undiagnostiziertem Diabetes in Ländern mit niedrigem und mittlerem Einkommen befinden (Beagley u. a. 2014).

Je länger eine Person mit undiagnostiziertem und unbehandeltem Diabetes lebt, desto schlechter ist das gesundheitliche Endergebnis. Glukosereduktion und

Lebensstilmodifikationen erweisen sich vor allem bei frühem Beginn als effektiv und können die Progression von mikrovaskulären Komplikationen verzögern. Essentiell für eine möglichst gute Prognose von Diabetespatienten ist somit auch eine möglichst frühzeitige Diagnosestellung (Holman u. a. 2008; Patel u. a. 2008).

Insbesondere bei einem frühen Beginn einer intensiven Blutglukosekontrolle zeigte sich ein verzögernder Effekt auf die Progression vaskulärer Komplikationen bei Diabetespatienten (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group 1993; Holman u. a. 2008).

Demgegenüber haben andere klinische Studien gezeigt, dass bei einem Start der Blutzuckernormalisierung nach einer durchschnittlichen Diabetesdauer von 8–11 Jahren, die Normalisierung der Hyperglykämie im Bezug auf die Reduktion kardiovaskulärer Risiken bei Diabetespatienten gescheitert ist (Boussageon u. a. 2011; Duckworth u. a. 2009).

Dies ist mit dem sogenannten hyperglykämischen Gedächtnis („hyperglykemic memory“) erklärbar, das heisst nach einer gewissen Dauer eines unbehandelten Diabetes, kein Effekt der Blutzuckernormalisierung auf das vaskuläre Endothel mehr zu beobachten ist. Pathophysiologisch sind ROS in die Persistenz von vaskulärem Stress nach Glukosenormalisierung involviert (Ihnat u. a. 2007). Paneni u. a. identifizierten das mitochondriale Adapterprotein p66^{Shc} als zentralen Vermittler hyperglykämischen Stresses im Kontext des Phänomen des hyperglykämischen Gedächtnisses. Die Hochregulation des p66^{Shc}-Proteins konnte in diabetischen Mäusen und menschlichen Endothelzellen durch Glukosenormalisierung nicht wieder umgekehrt werden. Die Exposition gegenüber Hyperglykämie führt zu einer Aktivierung von p66^{Shc} durch Phosphorylierung an Serin-36 durch die PKC β II. Dadurch bedingte ROS-Bildung führt wiederum zu einer persistierenden PKC β II-Hochregulation und damit Aufrechterhaltung der p66^{Shc}-Aktivierung, sowie zu einer PKC β II-abhängigen eNOS-Hemmung durch Phosphorylierung an Threonin-495, sodass ein zerstörender Teufelskreis der endothelialen Dysfunktion trotz Wiederherstellung der Normoglykämie entsteht (Paneni u. a. 2012). Dies macht therapeutische Angriffspunkte nötig, welche in die Pathomechanismen der Spätfolgen eingreifen, zumal die Diagnose eines Diabetes mellitus Typ 2 meist erst nach längerer Krankheitsdauer gestellt wird.

Die Inhibition der Proteinkinase C ist vor dem Hintergrund ihrer Involvierung in den oberhalb beschriebenen Teufelskreis und aufgrund von zahlreichen Untersuchungen über den Einfluss der PKC auf die endotheliale Dysfunktion ein wichtiger therapeutischer Angriffspunkt und soll in dieser Arbeit im Bezug auf die Angiogenese genauer untersucht werden.

Zudem zeigte Kabat 2004 in seiner Arbeit, dass Salbutamol eine β_2 -Adrenozeptor vermittelte Stimulation der NO-Freisetzung im Diabetesmodell bewirkt (Kabat u. a. 2004). Daher ist auch

Salbutamol als typischer β_2 -Adrenozeptoragonist vor dem Hintergrund einer unter Hyperglykämie verminderten NO-Bioverfügbarkeit, ein eventuell interessanter neuer therapeutischer Ansatz zur Verbesserung der Gefäßfunktion beim Diabetes, der in Bezug auf die Angiogenese in dieser Arbeit weiter untersucht werden soll.

2. Fragestellung

Ziel der Arbeit war es, die Effekte chronischer Hyperglykämie auf die Angiogenese im Zellkulturmodell mit humanen umbilicalen Endothelzellen zu untersuchen und die molekularen Signalwege, welche in die angiogenetische Antwort unter Bedingungen der Hyperglykämie involviert sind, zu verdeutlichen – mit dem Ziel mögliche therapeutische Angriffspunkte –, insbesondere durch Proteinlinase C-Hemmung und β_2 -Adrenozeptorstimulation, zu finden.

- a)** Kann bei den verwendeten Zellkulturen (HUVEC) eine Veränderung der Angiogenese im Angiogeneseassay unter Langzeit-Inkubation mit erhöhten Glukosekonzentrationen gezeigt werden?
- b)** Haben L-Glukose (entspricht der osmotischen Kontrolle) und 3-O-Methyl-D-Glukose einen Einfluss auf die Angiogenese?
- c)** Sind die Hyperglykämie-Effekte durch den PKC-Hemmer BIM antagonisierbar?
- d)** Sind die Hyperglykämie-Effekte durch Salbutamol antagonisierbar?

3. Material

3.1. Zellkultur

Geräte für Zellkultur	Typ	Hersteller	Stadt/ Land
Absaugeinrichtung	Zellkultur/Mikrobiologie	NeoLab	Heidelberg/ Deutschland
Alufolie	1399.1	Carl Roth GmbH und Co AG	Karlsruhe/ Deutschland
Autoklavierband	Steri Clin 811509	VP-Group	Feuchtwangen/ Deutschland
Bottle Top Filteraufsatz	TPP® “rapid” 500 0,22µm PES	TPP AG	Trasadingen/ Schweiz
Brutschrank	Typ BB 16, 16CU	Heraeus Instruments GmbH	Hanau/ Deutschland
Dampfsterilisator	Varioklav 75T	HP Medizintechnik GmbH	Oberschleißheim/ Deutschland
Dampfsterilisator	VAPOUR-Line 80/135	VWR International bvba	Leuven/ Belgien
Feinwaage	CP225D	Sartorius AG	Göttingen/ Deutschland
Gefrierschrank	-20 °C	Robert Bosch GmbH	Gerlingen- Schillerhöhe/ Deutschland
Kühlschrank	4 °C	SEG Hausgeräte GmbH	München/ Deutschland
Kühlschrank	4 °C	Robert Bosch GmbH	Gerlingen- Schillerhöhe/ Deutschland
Magnetrührer	MR2002	Heidolph Instruments GmbH und Co.KG	Schwabach/ Deutschland

Mikroskop (Hellfeld)	Axiovert 25	Carl Zeiss GmbH	Jena/ Deutschland
pH-Meter	pH Level 1 InoLab	WTW Wissenschaftlich- Technische Werkstätten GmbH	Weilheim/ Deutschland
Pipetus	SP-104-SA-VD	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG	Eberstadt/ Deutschland
UV-Lampe	UVC 30	Thermo Fischer Scientific	Langenselbold/ Deutschland
Vortex Mixer	VM 300	Gemmy industrial Corp.	Taipei/ Taiwan
Wärmebad	Typ 1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH	Burgwedel/ Deutschland
Wasseraufbereitung sanlage	Q-Gard2	EMD Millipore Corporation	Billerica/ USA
Zellkulturbank	Typ HS12	Heraeus Instruments GmbH	Hanau/ Deutschland
Zentrifuge	Biofuge stratos	Heraeus Instruments GmbH	Osterode/ Deutschland

Hilfsmittel für Zellkultur	Typ	Hersteller	Stadt/Land
Chirurgisches Nahtmaterial	Vicryl * Plus 2-0 resorbierbar	Ethicon Company	St-Stevens- Woluwe/ Belgien
Deckgläser	22 x 22 mm	Menzel GmbH und Co. KG	Braunschweig/ Deutschland
Einmalspritzen	10 ml, 50 ml	BD	Fraga/ Spanien
Glasflaschen	250 ml, 500 ml, 1000 ml	Duran®, Schott	Wertheim (Main)/ Deutschland
Handschuhe	Niril Next Gen	Meditrade	Ljubljana/ Slowakei
Messbecher	100 ml, 200 ml, 2000 ml	DURAN Group GmbH	Wertheim (Main)/ Deutschland
Neubauer Zähl- kammer	Depth Profondeur	Superior	Lauda Königshofen/ Deutschland
OP-Besteck für die HUVEC- Präparation	Schere, Klemmen, Knopfkanülen mit Schlauchansatz	Aesculap AG	Tuttlingen/ Deutschland
Parafilm	M	Pechiney	Chicago/ USA
Pastette	LW 4111 3 ml Graduated	Alpha Laboratories Limited	Hampshire/ UK
Pasteurpipetten aus Glas		Carl Roth GmbH + Co AG	Karlsruhe/ Deutschland
Pipetten		Eppendorf AG	Hamburg/ Deutschland
Pipettenspitzen	10 µl, 100 µl, 1000 µl	Greiner-Bio-One GmbH	Frickenhausen/ Deutschland
Serologische Pipettenspitzen	5 ml, 10 ml, 25 ml	TPP AG	Trasadingen/ Schweiz

Spritzenfilter	0,22 µm	TPP AG	Trasadingen/ Schweiz
Stift	Multimarker 1525 permanent S	Faber-Castell	Stein/ Deutschland
Timer	KT188	Carl Roth GmbH und Co AG	Karlsruhe/ Deutschland
Wiegeschalen	41x41x8 mm 89x89x22 mm	Carl Roth GmbH und Co AG	Karlsruhe/ Deutschland
Zellkulturplatte	6-Well	TPP AG	Trasadingen/ Schweiz
Zellstoff	Kleenex	Kimberly-Clark Professional	Koblenz- Rheinhafen/ Deutschland
Zentrifugen- röhrchen	50 ml, 10 ml	TPP AG	Trasadingen/ Schweiz

Biochemikalien	Typ	Hersteller	Stadt/ Land
Zellkultur			
Accutase®Solution		Sigma Aldrich und Chemie GmbH	Steinheim/ Deutschland
Collagenase	Typ IV CLS 320 Units/mg	Biochrom AG	Berlin/ Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)		Cell Concepts GmbH	Umkirch/ Deutschland
Gelatine	Gelatine from porcine skin	Sigma Aldrich und Chemie GmbH	Steinheim/ Deutschland
M199	Earle-SalzeKn + L- Glutamin, Hepes	BioWhittaker	Lonza/ Belgien
Penicillin- Streptomycin	10000 units Penicillin/ml, 10 mg Streptomycin/ml	Sigma Aldrich und Chemie GmbH	Steinheim/ Deutschland
Trypsin	EDTA-Solution	Sigma Aldrich und Chemie GmbH	Steinheim/ Deutschland
Wachstumsfaktoren	endothelial cell growth supplement 1:100 verdünnt	c.c.pro	Oberdorla/ Deutschland
Nabelschnüre			Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde; Universitätsklinikum Leipzig

Chemikalien für die Zellkultur	Typ	Hersteller	Stadt/ Land
Ascorbinsäure	L-Ascorbic acid BioXtra, $\geq 99.0\%$, crystalline	Sigma Aldrich und Chemie GmbH	Steinheim/ Deutschland
Aqua bidest.	Milli® Q Academic System	Millipore GmbH	Schwalbach/ Deutschland
Bisindolylmaleimid 1		Sigma Aldrich und Chemie GmbH	Saint Louis/ USA
D-Glukose	α -D(+)-Glukose Monohydrat	Merck	Darmstadt/ Deutschland
KCL		Merck	Darmstadt/ Deutschland
KH ₂ PO ₄	$>99,5\%$	Carl Roth GmbH und Co. AG	Karlsruhe/ Deutschland
L-(-)-Glukose	$\geq 99,9\%$	Sigma-Aldrich COMPANY LTD.	Dorset/ UK
NaCl	$>99,5\%$	Carl Roth GmbH und Co. AG	Karlsruhe/ Deutschland
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O		Merck	Darmstadt/ Deutschland
3-O-Methyl-D-Glucopyranose	$\geq 98\%$	Sigma Aldrich und Chemie GmbH	Steinheim/ Deutschland
Salbutamol		Sigma Aldrich und Chemie GmbH	Buchs/ Schweiz
Trypan Blue Stain	0,4 %	GIBCO Life Technologies GmbH	Karlsruhe/ Deutschland

3.2. Angiogeneseassay

Geräte für das Angiogeneseassay	Typ	Hersteller	Stadt/Land
Computer		Fujitsu Technology Solutions GmbH	Berlin/ Deutschland
Eismaschine	2BE 30-10	ZIEGRA-Eismaschinen	Isernhagen/ Deutschland
Fotoapparat	Power Shot G5	Canon Europe Ltd	Middlesex/ England
Mikroskop Hellfeld/Fluoreszenz	Axioplan2 mit AxioCam MRC5, HBO100, HAL100, EBQ100	Carl Zeiss GmbH	Jena/ Deutschland

Hilfsmittel für das Angiogeneseassay	Typ	Hersteller	Stadt/Land
Chamber-Slide- Objektträger + Slide Separator	Lab-Tek ® II Chamber Slide™ System, 8 Well Glass Slide	NUNC ™ part of Thermo Fisher Scientific	Naperville/ USA
Deckgläser	24x32 mm	Carl Roth GmbH und Co AG	Karlsruhe/ Deutschland
Eppendorfgefäße	0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Greiner-Bio-One GmbH	Frickenhausen/ Deutschland
Objektträger	Super Frost Plus	Thermo Fisher Scientific	Langenselbold/ Deutschland
Rundbodenröhrchen	1 ml	BD	Heidelberg/ Deutschland
Skalpell	Surgical Disposable Scalpel 11	B.Braun, Aesculap AG	Tuttlingen/ Deutschland

Chemikalien für das Angiogeneseassay	Typ	Hersteller	Stadt/Land
Angiogenesis Assay Kit	In vitro, Matrigel: Gel Solution & Diluent Buffer, ECM625	Merck KgaA	Darmstadt/ Deutschland
DAPI (4',6-Diamidine- 2'-phenylindole dihydrochloride)		Roche Diagnostics GmbH	Mannheim/ Deutschland
Fluoreszenzein- Deckmedium	Dako Fluorescent Mounting Medium	Dako North America	Carpinteria/ USA
FITC-lectin	Lectin from Ulex europaeus UEA I (gorse, furze) FITC conjugate, lyophilized powder	Sigma Aldrich und Chemie GmbH	Steinheim/ Deutschland

3.3. Allgemeine Chemikalien

Allgemeine Chemikalien	Typ	Hersteller	Stadt/ Land
Ethanol	vergällt, $\geq 99,8 \%$	Carl Roth GmbH und Co AG	Karlsruhe/ Deutschland
HCl	37 %	Carl Roth GmbH und Co AG	Karlsruhe/ Deutschland
KCl		Merck	Darmstadt/ Deutschland
KH ₂ PO ₄	>99,5 %	Carl Roth GmbH und Co. AG	Karlsruhe/ Deutschland
NaCl	>99,5 %	Carl Roth GmbH und Co. AG	Karlsruhe/ Deutschland
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O		Merck	Darmstadt/ Deutschland
NaOH	>99 %	Carl Roth GmbH und Co AG	Karlsruhe/ Deutschland

3.4. Herstellung der einzelnen Lösungen

3.4.1. Allgemeine Lösungen

Die allgemeine Arbeitsweise mit Zellkulturen erfolgte unter sterilen Bedingungen (Zellkulturbank Typ HS12).

Lösungen und Puffer

Phosphatpuffer (Phosphat buffered saline, PBS) pH 7,4

NaCl (Natriumchlorid):

MG = 58,44 g/mol	7,01 g/l	119,95 mmol/l
------------------	----------	---------------

KCl (Kaliumchlorid):

MG = 74,56 g/mol	0,2 g/l	2,68 mmol/l
------------------	---------	-------------

Na₂HPO₄ (Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat):

MG = 177,99 g/mol	1,71 g/l	9,6 mmol/l
-------------------	----------	------------

KH₂PO₄ (Kaliumdihydrogenphosphat):

MG = 136,09 g/mol	0,2 g/l	1,47 mmol/l
-------------------	---------	-------------

1 l PBS:

Zunächst wurden die Salze exakt eingewogen (Feinwaage) und mit 1 l Reinstwasser (Wasseraufbereitungsanlage Typ Q-Gard 2) in sterile (autoklavierte) 1000 ml-Glasflaschen gefüllt. Dann erfolgte die PH-Wertbestimmung mit dem PH-Meter, sowie die Einstellung des PH-Wertes mittels 1M HCl und 1M NaOH auf einen Wert von 7,4. Der Puffer wurde autoklaviert (Dampfsterilisator Vapour-Line 80/135). Danach bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Wie im Methodenteil beschrieben, wurden am Tag der Verwendung Penicillin-/ Streptomycinlösung in einem Verhältnis 1:100 hinzugegeben (1000 ml Puffer, 10 ml Antibiotika-Lösung).

Antibiotikallösung Penicillin-Streptomycin:

Die fertig gelieferte Penicillin-/ Streptomycinlösung wurde aufgetaut zu 10 ml steril in 10 ml-Zentrifugenröhrchen filtriert und somit gleichzeitig aliquotiert (mithilfe Spritzenfilter und Einmalspritzen).

3.4.2. Zellkultur

Gelatinelösung (1 %ig)

Gelatine	1 g
Aqua bidest	100 ml

1 g Gelatinepulver wurden in 100 ml Reinstwasser (Aqua bidest) in einer sterilen (autoklavierten) Glasflasche gelöst und autoklaviert. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C.

Transportlösung für die Nabelschnüre

PBS	200 ml
Antibiotikallösung Penicillin-Streptomycin	2 ml

In autoklavierte, sterile 250 ml-Glasflaschen wurden 200 ml PBS-Lösung (pH 7,4), sowie 2 ml Penicillin-/ Streptomycinlösung am Tag der Verwendung hinzugegeben.

Enzyme zur Zellpräparation und Subkultivierung

Kollagenaselösung

Collagenase Typ IV (320 U/1 mg)	65,625 mg
PBS-Lösung	50 ml

Die Kollagenaselösung wurde bei jedem Präparationsvorgang frisch hergestellt. Es wurden 21.000 U Kollagenasepulver abgewogen und in 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Danach mit 50 ml steriler, im Wasserbad vorgewärmter (37 °C) PBS-Lösung aufgefüllt und steril in zweites 50 ml-Zentrifugenröhrchen filtriert (mithilfe Spritzenfilter und Einmalspritzen) und sofort verwendet.

Akkutaselösung

Die fertige Akkutaselösung wurde aufgetaut zu 10 ml steril in 10 ml-Zentrifugenröhrchen filtriert und somit aliquotiert (mithilfe Spritzenfilter und Einmalspritzen).

Trypsinlösung

Die fertige Trypsinlösung wurde aufgetaut zu 10 ml steril in 10 ml-Zentrifugenröhrchen filtriert und somit aliquotiert (mithilfe Spritzenfilter und Einmalspritzen).

Präparationsmedium und Kulturmedium

FKS (Fetales Kälberserum):

Das Fetale Kälberserum wurde auf 50 ml aliquotiert und bei -20 °C gelagert, um eventuell die Zellkultur beeinträchtigende Antikörper und das Komplementsystem zu inaktivieren. Vor der Verwendung wurde das Fetale Kälberserum im Wärmebad (37 °C) aufgetaut und steril filtriert (mithilfe Spritzenfilter und Einmalspritzen).

Präparationsmedium (100 ml)

Medium 199	100 ml (100 %)
FKS	10 ml (10 %)
Penicillin-/ Streptomycinlösung	1 ml (1 %)

Steril filtrierten Ingredienzien wurden in autoklavierte Glasflaschen pipettiert und der pH-Wert mittels 1M HCl und 1M NaOH auf 7,4 eingestellt. Die maximale Verwendungsdauer betrug bei Lagerung im Kühlschrank (4 °C) 7 Tage.

Kulturmedien:

1. Normoglykämisches Medium (N)

Medium 199 (5 mmol/l D-Glukose)	100 ml
FKS	10 ml (10 %)
Penicillin-/ Streptomycinlösung	1 ml (1 %)
Wachstumsfaktoren	1 ml (1 %)

2. Hyperglykämisches Medium (G)

D-Glukose 15 mmol/l (in normoglykämisches Medium)

➔ Endkonzentration: 20 mmol/l D-Glukose

3. Normoglykämisches Medium mit Salbutamol (N+S)

Salbutamol 20 nmol/l (in normoglykämisches Medium)

4. Hyperglykämisches Medium mit Salbutamol (G+S)

Salbutamol 20 nmol/l (in hyperglykämisches Medium)

5. Normoglykämisches Medium mit 3-*O*-Methyl-D-Glukose (OMD)

3-*O*-Methyl-D-Glukose 15 mmol/l (in normoglykämisches Medium)

➔ Endkonzentration: 15 mmol/l 3-*O*-Methyl-D-Glukose + 5 mmol/l D-Glukose

6. Hyperglykämisches Medium mit Bisindolylmaleimid 1 (G+BIM)

Bisindolylmaleimid 1 2 µmol/l (in hyperglykämisches Medium)

7. Medium zur osmotischen Kontrolle mit L-Glukose (OK)

L-Glukose 15 mmol/l (in normoglykämisches Medium)

➔ Endkonzentration: 15 mmol/l L-Glukose + 5 mmol/l D-Glukose

Die steril filtrierte Ingredienzien wurden in autoklavierte Glasflaschen pipettiert und der pH-Wert mittels 1M HCl und 1M NaOH auf 7,4 eingestellt. Die maximale Verwendungsdauer betrug 7 Tage bei einer Lagerung im Kühlschrank (4 °C).

3.4.3. Angiogeneseassay

Matrigel:

Diluentpuffer 80 µl

Gelsolution 720 µl

Ausführliche Herstellung siehe Methodenteil.

FITC-Lektin-Lösung:

FITC-Pulver 1 mg

Präparationsmedium 1 ml

1 mg FITC-Pulver (Lektin from *Ulex Europaeus*) wurde in 1 ml Präparationsmedium einem 1 ml-Rundbodenröhrchen gelöst und bei -20 °C eingefroren und gelagert. Die FITC-Lösung wurde für jeden Versuch aufgetaut. Diese Arbeitsschritte wurden im Dunkeln durchgeführt und fertige Lösung im Rundbodenröhrchen mit Alufolie umwickelt, da FITC lichtempfindlich ist.

3.5. Software

Microsoft Word 2013: Microsoft Deutschland GmbH; Unterschleißheim/ Deutschland

Microsoft Excel 2013: Microsoft Deutschland GmbH; Unterschleißheim/ Deutschland

Microsoft Power Point 2013: Microsoft Deutschland GmbH; Unterschleißheim/ Deutschland

Software AxioVision 4.5: Carl Zeiss Jena GmbH; Jena/ Deutschland

SigmaPlot 13.0: Systat Software GmbH; Erkrath/Deutschland

GraphPad Prism 5: GraphPad Software GmbH; Santiago/USA

4. Methoden

4.1. Ethikerklärung

Die durchgeführten Experimente wurden von der Ethik-Kommission der Universität Leipzig genehmigt (Aktenzeichen: 162-10-12072010) und unterliegen den Prinzipien der Deklaration von Helsinki.

Die Nabelschnüre stammen aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde des Uniklinikums Leipzig. Die Mütter waren vor der Geburt über die Verwendung des Nabelschnurgewebes aufgeklärt worden und hatten ihr Einverständnis mit einer Unterschrift bezeugt.

4.2. Versuchsaufbau

Für die Versuche wurden Humane Umbilicale Endothelzellen (HUVEC) aus menschlichen Nabelschnurvenen verwendet, um eine bessere Reproduzierbarkeit des *in vitro* Zellkulturmodells auf die Situation *in vivo* zu gewährleisten.

Es wurden $n = 6$ Versuchsreihen mit jeweils 7 Versuchsgruppen durchgeführt, wobei die Endothelzellen eines Versuchansatzes mit 7 Versuchsgruppen aus gepoolten Zellen mehrerer Nabelschnurvenen entstammten, um die jeweiligen genetischen Variationen so minimal wie möglich zu halten.

Nach der Präparation der Zellen wurde die erste Zellkultur als Passage P0 bezeichnet und für 3–6 Tage mit einem normoglykämischen Kulturmedium (5 mmol/l D-Glukose) kultiviert. Die eigentlichen Experimente (Angiogeneseassay) wurde mit Zellen aus den Passagen P1, P2 und P3 durchgeführt.

Zellen die älter als Passage 3 waren, wurden nicht verwendet, genauso wie Zellen der Passage 0 nicht verwendet wurden, um Verfälschungen durch das Passagealter zu minimieren.

Die 7 Versuchsgruppen wurden etabliert, indem die Zellen (je 2 Well = $2 \times 9,6 \text{ cm}^2$) mit speziellen Kulturmedien (siehe Auflistung) für eine Passage (3–6 Tage), das heißt von der Aussaat bis zur Konfluenz (Zellen bedecken das Kulturgefäß mindestens bis zu 80 %) subkultiviert wurden.

Versuchsgruppen:

1. Normoglykämie (N):

Zellkulturmedium mit 5 mmol/l D-Glukose

2. Hyperglykämie (G):

Zellkulturmedium mit 20 mmol/l D-Glukose

3. Normoglykämie + Salbutamol (N+S):

Zellkulturmedium mit 5 mmol/l D-Glukose plus 20 nmol/l Salbutamol

4. Hyperglykämie + Salbutamol (G+S):

Zellkulturmedium mit 20 mmol/l D-Glukose plus 20 nmol/l Salbutamol

5. Normoglykämie + 3-O-Methyl-D-Glukose (OMD):

Zellkulturmedium mit 5 mmol/l D-Glukose plus 15 mmol/l 3-O-Methyl-D-Glukose

6. Hyperglykämie + Bisindolylmaleimid 1 (G+BIM):

Zellkulturmedium mit 20 mmol/l D-Glukose plus 2 µmol/l Bisindolylmaleimid

7. Osmotische Kontrolle mit L-Glukose (OK):

Zellkulturmedium mit 5 mmol/l D-Glukose plus 15 mmol/l L-Glukose

Der Sinn dieser Subkultivierung unter speziellen Kulturbedingungen bestand in der Simulation einer chronischen Stoffwechselsituation. So wurde durch die erhöhte Glukosekonzentration im hyperglykämischen Kulturmedium (20 mmol/l D-Glukose) ein Diabetes mellitus *in vitro* simuliert.

Die Konzentrationen für D-Glukose als chronische Hyperglykämie-Situation, L-Glukose als osmotische Kontrolle und Salbutamol als Therapeutikum *in vitro* sind der Arbeit von Kabat und Dhein mit Endothelzellen aus Schweinearterien, sogenannte PAEC, entlehnt (Kabat & Dhein 2006).

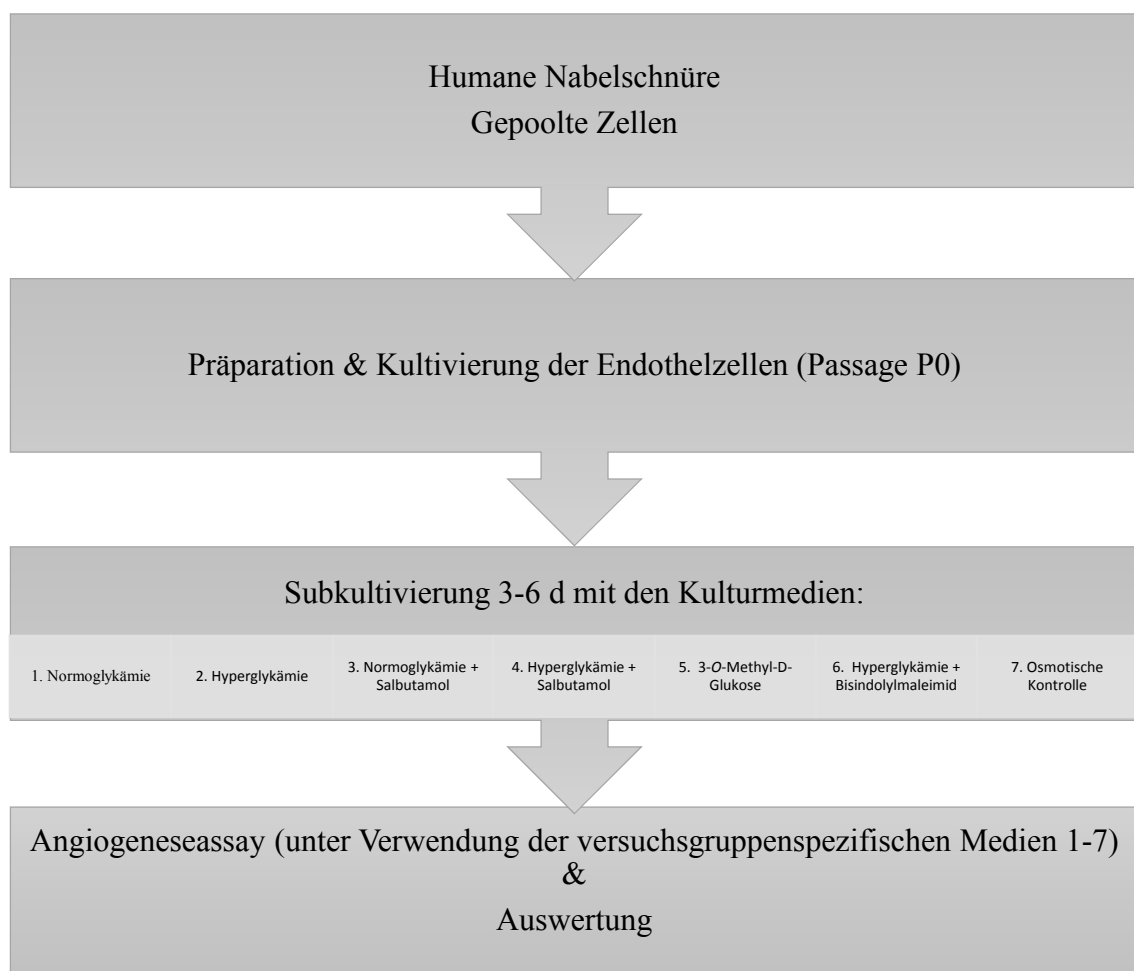
Die Konzentration von Salbutamol musste aufgrund der aktuellen Verwendung von humanen umbilicalen Endothelzellen (HUVEC) von 100 nmol/l auf 20 nmol/l erniedrigt werden, da sich bei der von Kabat und Dhein entlehnten Salbutamolkonzentration (100 nmol/l) ein negativer Wachstumseffekt, sowie teilweise Apoptose der HUVEC in der Zellkultur zeigte.

Nach Subkultivierung für die Dauer einer Passage und nach Erreichen von mindestens 80 %iger Konfluenz der Endothelzellen erfolgte die Durchführung des Angiogeneseassays unter Verwendung der versuchsgruppenspezifischen Medien.

Angiogenese ist per definitionem der Prozess der Erzeugung neuer kapillärer Blutgefäße aus vorbestehenden Blutgefäßen (Risau 1997), während das Angiogeneseassay ein System für die Bewertung der Blutgefäßbildung aus Endothelzellen darstellt. Dabei besteht die Möglichkeit der Untersuchung verschiedener potenzieller Stimulanzen oder Inhibitoren der Angiogenese, wobei diese sowohl chronisch durch die beschriebenen 7 Kulturmedien für die Dauer einer Passage, als auch durch den akuten Einfluss der 7 Kulturmedien während des 12–14-stündigen Angiogeneseassays Einfluss hatten.

Bei der Auswertung des Angiogeneseassays lieferten (a) die Kapillarlänge, (b) die Anzahl der Verknüpfungspunkte, (c) der Quotient aus Verknüpfungspunkten und Kapillarlänge, (d) die Bewertung der Komplexität des Kapillarnetzwerkes durch ein Punktesystem (vgl. S. 39), sowie (e) die Zellzahl pro 1 mm² eine Aussage über den Einfluss der verschiedenen Versuchsbedingungen. Parameter nach: (Gärtner u. a. 2012).

Schematisches Vorgehen für einen Versuchsansatz n. Die Durchführung erfolgte 6 Mal (n=6):



4.3. Zellkultur

4.3.1. Gelatinebeschichtung von Zellkulturgefäßen

Durch Gelatinevorbeschichtung der Kulturgefäße kann die Adhäsion der Zellen in Kultur gefördert werden (Schmitz 2011).

Sterile 6-Well-Zellkulturplatten wurden mit 1 ml einer zuvor im Wasserbad auf 37 °C aufgewärmten Gelatinelösung pro Well bedeckt (mit Serologischen Pipetten) und für mindestens 30 Minuten mit Deckel im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die Gelatinelösung wurde abgesaugt (mit Pasteurpipetten aus Glas) und durch zweimalige Zugabe von 2 ml steriler PBS-Lösung pro Well gewaschen (Zugabe und Absaugen). Um Bakterienkontaminationen vorzubeugen wurden die beschichteten Zellkulturgefäße sofort verwendet.

4.3.2. Präparation von Endothelzellen

Die Zellisolation erfolgte nach Modifikation gemäß des Präparationsprotokolls von Gärtner-Grätz (Gärtner u. a. 2012).

In der Abteilung der Geburtsmedizin des Universitätsklinikums Leipzig (Liebigstr. 20a, 04103 Leipzig) wurden Glasflaschen mit sterilem, antibiotikaangereichertem Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,4 (PBS+ Penicillin-/Streptomycinlösung) bei 4 °C im Kühlschrank bereitgestellt, welche unmittelbar nach einer Geburt mit jeweils einer Nabelschnur durch Geburtshelfer befüllt wurden.

Die Nabelschnurgefäße wurden mindestens jeden vierten Tag abgeholt. Die Zellisolation erfolgte zeitnah nach dem Transport in das Chirurgie-Labor des Herzzentrums Leipzig, sodass die Nabelschnüre nach der Durchtrennung nicht älter als vier Tage waren.

Die Zellisolation wurde unter sterilen Arbeitsbedingungen (Zellkulturbank Typ HS12) und mit autoklaviertem Präparationsbesteck (Dampfsterilisator Vapour-Line 80/135) durchgeführt.

Mit geschlossener Klemme wurde die Vene von beiden Seiten geweitet, jeweils eine Knopfkanüle vorgeschoben und 1 cm vor Ende der Nabelschnur mit Vicrylfaden befestigt, sodass die Vene mit 50 ml sterilem PBS + 0,5 ml Penicillin-/Streptomycinlösung blutfrei gespült werden konnte.

Im Folgenden wurden 25 ml der frisch zubereiteten, 37 °C warmen Kollagenaselösung in die Nabelschnurvene gefüllt, beide Enden am Gummischlauch der Knopfkanüle mit einer Klemme

verschlossen. Zur Desaggregation der Endothelzellen durch die Enzymlösung wurde die Nabelschnur für 20 Minuten im mit PBS-Lösung gefüllten Wasserbad (37 °C) unter der Sterilbank inkubiert.

Danach wurde die Nabelschnur leicht geschüttelt, um die Desaggregation der Zellen zu unterstützen.

Durch die Spülung der Nabelschnurvene mit 10 ml Präparationsmedium, trennten sich die Endothelzellen endgültig aus ihrem Gewebeverband und konnten samt der Enzymlösung in einem sterilen 50ml-Tube aufgefangen werden.

Die Zellsuspension wurde nun bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert (Zentrifuge Typ Biofuge stratos), der Überstand abgesaugt und in 1 ml Präparationsmedium resuspendiert (davon 20 µl für die Zellzählung).

In frisch mit 1 %iger Gelatine beschichtete 6-Well-Platten (9,6 cm², TPP, Schweiz) wurden 2 ml normoglykämisches Kulturmedium pro Well vorgelegt und nach der Zellzählung (Neubauer Zählkammer) 200.000 Zellen pro Well ausgesäht.

Durch dieses Vorgehen entstand die Primärkultur von HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells), die als Passage 0 bezeichnet wurde.

Das weitere Wachstum der Zellkultur bis hin zur 80 %igen Konfluenz erfolgte im Brutschrank (Brutschrank Typ BB16CU) bei 37 °C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂. Der erste Mediumwechsel fand nach 24 Stunden statt, wobei die Zellkultur zunächst mit steriler PBS-/Penicillin-/Streptomycinlösung (Verhältnis 1:100) gespült wurde, um sie von Präparationsfragmenten und Erythrozyten zu befreien, sowie Bakterienkontaminationen vorzubeugen.

In der folgenden Zeit erfolgte der Mediumwechsel alle 48 Stunden.

4.3.3. Kultivierung und Passage der Endothelzellen

Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C und mit 5 % CO₂ wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 48 Stunden.

Die Endothelzellen wuchsen in einschichtiger Lage auf dem Boden der Kulturfäße bis sie nach 4 ± 1 Tagen eine mindestens 80 %ige Konfluenz erreichten und passagiert werden konnten.

Zur Subkultivierung der Zellen wurde eine Akkutaselösung verwendet. Um die optimale Enzymwirkung zum Ablösen der Zellen zu erreichen, wurde zunächst das normoglykämische Kulturmedium abgesaugt und die Zellkultur mit 2 ml PBS-Lösung je Well einer 6-Wellplatte

gewaschen (Zugabe: Serologische Pipetten, Absaugen: Pasteurpipetten aus Glas). Danach wurden 1 ml Akkutase je Well hinzugegeben und nach 3 Minuten Inkubationszeit im Brutschrank, konnte eine ausreichende Akkutasewirkung unter dem inversen Mikroskop als abgelöste, kugelige Zellen sichergestellt werden.

Im Folgenden wurde die Enzymwirkung mit 2 ml Kulturmedium je Well abgestoppt und diese Zellsuspension in einem 10 ml-Zentrifugenröhrchen unmittelbar für 10 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert.

Das bei der Zentrifugation entstandene Zellpellet wurde in 1 ml Kulturmedium resuspendiert, während der Überstand verworfen wurde.

Die Endothelzellen wurden mit einer Split Ratio von 1:2 passagiert, das heisst die abgelösten Zellen wurden auf der jeweils doppelten Fläche subkultiviert. Jeder Akkutase-Vorgang galt dabei als eine neue Passage.

4.4. Angiogenese Assay (3D-Kultur)

Das Angiogenese Assay (*in vitro* Angiogenese Assay Kit Typ ECM625) ist ein gebräuchliches System, um die Bildung neuer kapillärer Blutgefäße aus Endothelzellen unter der Einwirkung potenzieller Stimulanzen und Inhibitoren der Gefäßneubildung zu untersuchen.

Insgesamt wurden 7 Versuchsgruppen etabliert, welche dadurch zustande kamen, dass die Zellen (je 2 Well einer 6-Well-Zellkulturplatte) mit speziellen Kulturmedien (siehe Auflistung Seite 31) für eine Passage von 3 bis 6 Tagen kultiviert wurden und zusätzlich für die Zeit des Angiogenese Assays.

Die Durchführung des Angiogenese Assays erfolgte nach Erreichen einer mindestens 80%igen Konfluenz der Zellen.

4.4.1. Versuchsprotokoll Tag 1

Vor Versuchsbeginn wurde das Matrigel (ein festes Gel auf der Basis von Proteinen, sowie bestehend aus Laminin, Kollagen Typ IV, Heparan Sulfat Proteoglykanen, Entactin, Nidogen, Proteolytischen Enzymen und zahlreichen Wachstumsfaktoren wie TGF- β , FGF) vorbereitet, auf welchem in einzelnen Kammern eines Chamber-Slide Objektträgers die Angiogenese der humanen umbilicalen Endothelzellen stattfinden sollte.



Abbildung 1: Chamber-Slide-Objektträger

G	G+S	G+BIM	OK
N	N+S	OMD	

Abbildung 2: Anordnung der Versuchsgruppen im Chamber-Slide-Objektträger

4.4.2. Matrigelherstellung

Hergestellt wurde das Matrigel aus einer in einem *in Vitro* Angiogenese Assay Kit (*in vitro* Angiogenese Assay Kit Typ ECM625, Merck KgaA) enthaltenen Gelsolution und einem Diluentpuffer, welche bei -20 °C gelagert wurden. Das bereits hergestellte Matrigel konnte nicht erneut eingefroren werden, sodass für jeden Versuch die erforderliche Menge neu gemischt wurde.

Da die Ingredienzien über 8 °C sehr schnell fest wurden, war es erforderlich mit eisgekühlten Pipettenspitzen, Chamber-Slide-Objektträger und Rundbodenröhrchen zu arbeiten. Zudem musste die Gelsolution und der Diluentpuffer über Nacht auf Eis aufgetaut werden.

Es wurden 80 µl Diluentpuffer und 720 µl Gelsolution in ein steriles, eisgekühltes Rundbodenröhrchen gefüllt, leicht mit der Pipettenspitze gemischt, sodass keine Luftblasen in die Lösung gerieten. Zügig wurden nun 100 µl des Matrigels vor dem Festwerden pro Kammer des Chamber-Slide-Objektträgers (Abbildung: 1) eingefüllt und mindestens für 1 Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

4.4.3. FITC-Lektin-Färbung

Der Fluoreszenzfarbstoff FITC ist an das Glykoprotein Lektin gekoppelt und kann somit spezifisch an Kohlenhydratstrukturen auf der Zellmembran humaner Endothelzellen binden. Die folgenden Versuchsschritte konnten in der Inkubationszeit des Matrigels durchgeführt werden. Dabei wurde aufgrund der lichtempfindlichen FITC-Lösung im Dunkeln gearbeitet. Zunächst wurden 140 µl der auf Eis aufgetauten FITC-Lösung in 14 ml Präparationsmedium gelöst (in einem sterilem 10 ml-Zentrifugenröhrchen) und mit dem Vortex-Mixer durchmischt. Dann wurden die 2 ml des jeweiligen Kulturmediums pro Well mithilfe von Glaspipetten auf 500 µl reduziert, um anschließend 1 ml der FITC-Präparationsmedium-Lösung in jedes Well hinzuzugeben, vorsichtig zwecks Durchmischung zu schwenken und dann für 45 min bei 37 °C im Brutschrank zu inkubieren.

Anschließend wurde die Medium-FITC-Lösung je Well mit einer Glaspipette abgesaugt und ein ähnlicher Vorgang wie bei der Passage/Subkultivierung von Zellen begonnen mit dem Ziel die Zellen aus ihrem Zellverband zu lösen und im Angiogeneseassay auszusähen. Dazu wurden zunächst die PBS-Lösung, die Trypsinlösung, das Präparationsmedium und die 7 versuchsgruppenspezifischen Kulturmedien im Wasserbad auf 37 °C aufgewärmt.

Danach wurde die Zellkultur mit 2 ml je Well sterilem PBS gewaschen (Zugabe mit Serologischen Pipetten und Absaugen mit Glas-Pasteurpipetten). Pro Well wurde nun 1 ml Trypsinlösung hinzugegeben, für 3 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, die Zelllösung aus dem Zellverband unter dem inversen Mikroskop kontrolliert und die Enzymwirkung des Trypsins mit 2 ml Präparationsmedium pro Well abgestoppt.

Die 3 ml pro Well entstandenen Zellsuspensionen wurden getrennt in gemäß der Versuchsgruppen beschriftete 10 ml-Zentrifugenröhrchen überführt (N, G, N+S, G+S, OMD, G+BIM, OK). Durch die darauffolgende Zentrifugation bei 1200 rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur, entstand ein Überstand und ein Zellpellet. Das Zellpellet wurde in 200 µl des versuchsgruppenspezifischen Kulturmediums resuspendiert und die Zellzahl für jede Versuchsgruppe getrennt anhand einer Neubauerzählkammer ermittelt.

Pro Kammer des Chamber-Slide-Objektträgers wurden 400.000 Zellen (nötig um die Angiogenese zu gewährleisten) ausgesät ($\text{Zellen}/200\mu\text{l} = 400.000\text{c}/\text{x}$) und mit dem jeweiligem kulturspezifischen Medium auf 200 µl ergänzt. Der Chamber-Slide-Objektträger wurde für 12–14 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Bei einer Inkubationszeit länger als 18 h wurden die Zellen apoptotisch und einer Auswertung des Angiogeneseassays war nicht mehr möglich.

4.4.4. Versuchsprotokoll Tag 2

Nach 12–14 Stunden Inkubationszeit wurde von jeder Kammer des Chamber-Slide-Objektträgers ein repräsentatives Übersichtsbild (Fotoapparat, Power Shot G5, Canon) mit einer insgesamt 50-fachen Vergrößerung (Objektivvergrößerung 5, Okularvergrößerung 10) unter dem inversen Mikroskop (Hellfeld, Axiovert 25) angefertigt.

4.4.5. DAPI-Färbung

DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der selektiv an Doppelstrang-DNA bindet und fluoreszierende DNA-DAPI-Komplexe, aber keine cytoplasmatische Fluoreszenz ausbildet. Mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie gelingt so eine Darstellung der unter dem Fluoreszenzmikroskop blau leuchtenden Zellkerne, in denen sich primär die DNA befindet. Somit ist auch ein Rückschluss auf die Zellzahl möglich (eine Endothelzelle, ein Zellkern). Zudem ermöglicht die DAPI-Färbung eine Kontrolle auf Mycoplasmenkontaminationen, da sich dabei auch charakteristische blau fluoreszierende Herde außerhalb der Nuclei, also im Zytosol und teilweise auch in den intrazellulären Räumen finden.

Angiogenese Assays mit solchen Mycoplasmenkontaminationen mussten verworfen werden.

DAPI-Färbung Versuchsprotokoll

Zunächst mussten die Kapillaren auf die DAPI-Färbung vorbereitet werden, indem der gesamte Chamber-Slide-Objektträgers mit den darin enthaltenen Kulturmedien vorsichtig auf Zellstoff abgegossen wurde und dann 3 Mal mit 200 µl steriler 37 °C warmer PBS-Lösung gewaschen wurde.

Da auch die DAPI-Lösung lichtempfindlich ist, wurde im abgedunkelten Zellkulturlabor gearbeitet.

Die DAPI-Lösung wurde auf Eis aufgetaut und in einem Verhältnis von 1:500 in PBS gelöst (für 7 Kammern: 2,84 µl DAPI + 1400 µl PBS). Pro Kammer wurden 200 µl der DAPI-PBS-Lösung einpipettiert und für genau für 10 min bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die DAPI-PBS-Lösung auf Zellstoff abgegossen und pro Kammer 3 Mal mit 200 µl PBS gewaschen.

4.4.6. Auswertung Angiogenese Assay

Um das Gesamtnetzwerk der Kapillaren nicht zu zerstören, wurden die 7 Kammern sofort im Anschluss unter dem Phasenkontrastmikroskop (Zeiss Axiolab fluorescence microscope, Jena/Deutschland) mit einer insgesamt 50-fachen Vergrößerung (Objektivvergrößerung 5, Okularvergrößerung 10) mikroskopiert und 10 Bilder aus verschiedenen, zufälligen Bereichen je Kammer angefertigt. Diese Bilder dienten als Grundlage der Auswertung der Komplexität der Kapillarbildung und wurden mithilfe des Analyseprogramms Auxio Vision (Carl Zeiss Auxio Vision SE64 Rel.) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte nach der Zellzahl, Kapillarlänge, der Anzahl der Verknüpfungspunkte, dem Quotienten aus Verknüpfungspunkten und Kapillarlänge und nach der Komplexität des Kapillarnetzwerkes mittels Quantifizierung durch ein Punktesystem (Gärtner u. a. 2012), Abbildung: 3. Aus den Werten jeder Kammer mit der jeweiligen Versuchsgruppe wurde anschließend der Mittelwert gebildet.

Wert	Komplexität des Kapillarnetzwerkes
0	Einzelne, gut separierte Zellen
1	Zellen beginnen zu wachsen und sich auszurichten
2	Erste Kapillaren sichtbar, kein Wachstum
3	Wachstum neuer Straßen sichtbar, Kapillaren mit Abzweigungen
4	Geschlossenes Netzwerk bildet sich aus (mind. 2 Netze)
5	Komplex verzweigtes Netzwerk ausgebildet

Abbildung 3: Punktesystem zur Auswertung der Komplexität des Kapillarnetzwerkes

Um die Zellzahl zu ermitteln war eine insgesamt 200-fache Vergrößerung (Objektivvergrößerung 20, Okularvergrößerung 10) unter dem Fluoreszenzmikroskop nötig. Dazu mussten aus technischen Gründen beim Mikroskopieren die Kammern vom Chamber-Slide-Objektträger gelöst und dieser eingedeckelt werden.

4.4.7. Eindeckelung

Für die Lösung der Kammern des Chamber-Slide-Objektträgers vom Objektträger, wurden die äußeren Ränder der Kammern vorsichtig mit einem Skalpell umfahren, sowie ein mitgelieferter Slide-Seperator genutzt. Der Objektträger wurde nun mit 5 Tropfen Dako Mounting Medium eingedeckelt und ein Deckglas (24 x 32 mm) ohne Luftblasenbildung auflegt. Nach 2 Stunden Trockenzeit (lichtgeschützt) wurden weitere 5 Bilder pro Kammer mit einer insgesamt 200-fachen Vergrößerung (Objektivvergrößerung 20, Okularvergrößerung 10) noch am selben Tag angefertigt, da der FITC-Farbstoff in seiner Fluoreszenz nachlässt, sowie das Präparat auch nach einigen Tagen bis Wochen Luftblasen ziehen würde und nicht mehr auswertbar wäre.

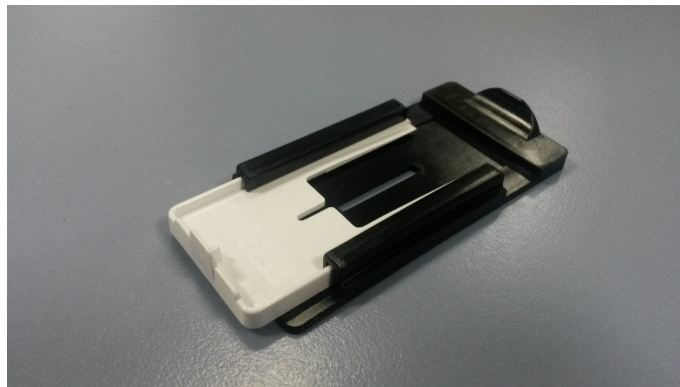


Abbildung 4: Slide Separator

4.5. Statistische Analyse und Textverarbeitung

Von den Daten wurden der Mittelwert (MW = arithmetisches Mittel) und der Standardfehler (SEM = standard error of means) bestimmt.

Die Signifikanz wurde mit dem Programm Sigma Plot mittels ungepaartem Mann-Whitney Rank Sum Test gezeigt. Dabei galt als Signifikanzniveau ein p-Wert $\leq 0,05$.

Der Auswertung, Berechnung und graphischen Darstellung dienten die folgenden Programme: Word 2013, Excel 2013, Power Point 2013 und GraphPadPrism Version 5.

5. Ergebnisse

5.1. Menschliche venöse Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVECs) in der Zellkultur

4 ± 1 Tag nach der Isolation und Aussaat erreichten die Endothelzellen eine mindestens 80 %ige Konfluenz. Sie wuchsen in einschichtiger Lage als Monolayer auf dem Boden der Kulturgefäße und zeigten ein typisches kopfsteinpflasterartiges (auch Cobble-Stone-Muster) Aussehen.

Mikroskopisch zeigten sich keine sichtbaren Verunreinigungen durch Bakterien oder Pilze.

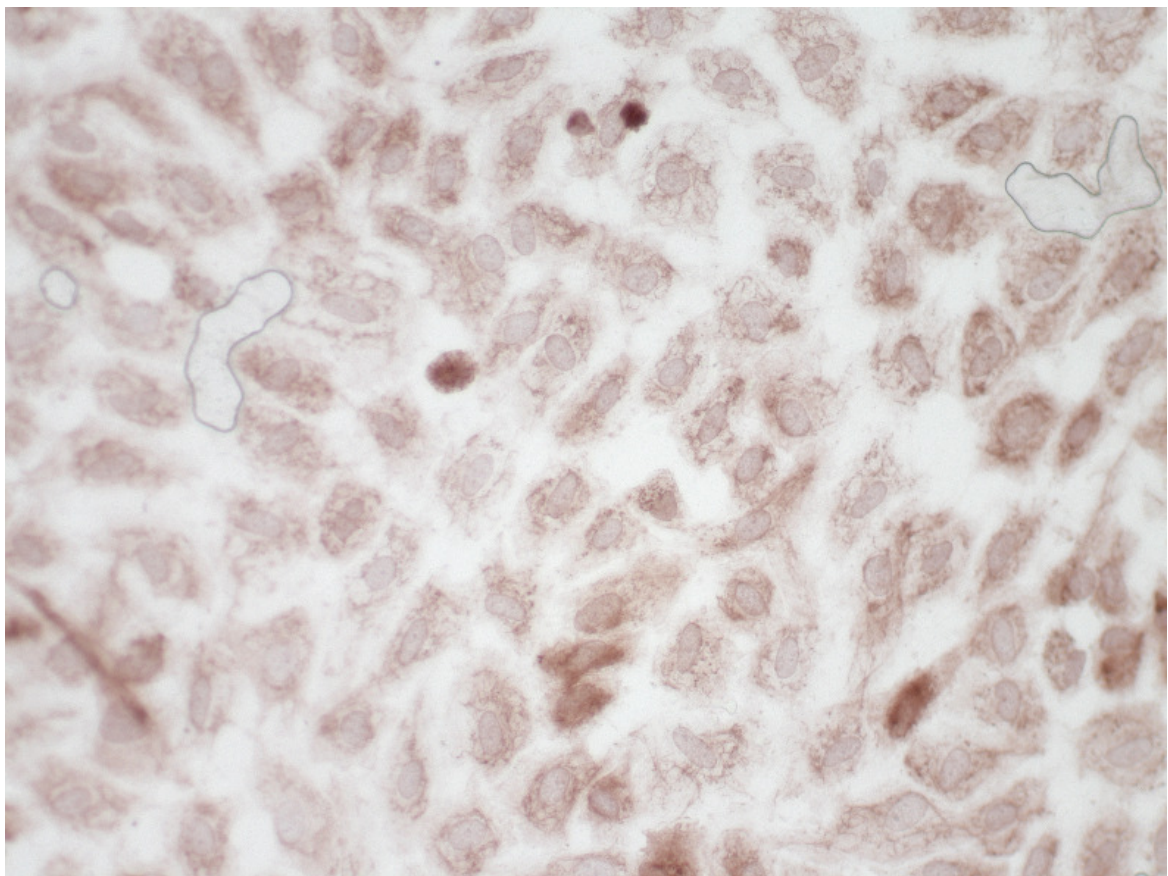


Abbildung 5: Konfluente HUVEC-Zellkultur mit AIF-Färbung bei 200-facher Vergrößerung (Objektivvergrößerung 20, Okularvergrößerung 10)

Die AIF (apoptosis inducing factor) – Färbung zeigt kaum Translokation des AIF in den Nucleus (< 5 % der Zellen) und ist somit ein Nachweis, dass die Zellen unter diesen Kulturbedingungen kaum Apoptose zeigten.

5.2. Der Einfluss von Hyperglykämie (D-Glukose), 3-O-Methyl-D-Glukose und L-Glukose auf die Angiogenese

Zur Beantwortung der Frage, ob eine Veränderung von Stoffwechselprozessen Einfluss auf die Angiogenese hat, wurden humane umbilicale Endothelzellen zunächst für 4 ± 1 Tage unter bestimmten Stoffwechselbedingungen im Sinne einer chronischen Stoffwechselsituation kultiviert und im Folgenden mithilfe des *in vitro* Angiogeneseassays untersucht. Nach 12–14 Stunden des Angiogeneseassays, ebenfalls unter versuchsgruppenspezifischen Bedingungen, waren die Endothelzellen in das Matrigel migriert und hatten kapillarähnliche Strukturen bis hin zur Ausbildung eines komplexen Netzwerkes angenommen.

Ausschlaggebend für den Grad der Komplexität war eine quantitativ hohe Anzahl von Verknüpfungspunkten, sowie ein hoher Quotient aus Verknüpfungspunkten und Kapillarlänge und semiquantitativ eine stark verzweigte Kapillarnetzstruktur (Bewertung durch Punktesystem, siehe Methoden Seite 39, Abbildung 3). Neben diesen Parametern wurden zusätzlich die Auswirkungen der Stoffwechselveränderungen auf die Zellzahl und die Kapillarlänge ermittelt. Die Kontrollgruppe stellte eine Zellkultur derselben Zelllinie unter normoglykämischen Bedingungen (5 mmol/l D-Glukose) dar (N).

Um den Einfluss von Hyperglykämie zu untersuchen, wurde eine Versuchsgruppe mit 20 mmol/l D-Glukose (G) etabliert.

Dabei zeigte sich im Bezug auf die Zellzahl im Vergleich zur normoglykämischen Kontrollgruppe (N) kein signifikanter Effekt. In Hinblick auf die gemessene Kapillarlänge zeigte die hyperglykämische Versuchsgruppe im Vergleich zur normoglykämischen Kontrollgruppe eine signifikante Zunahme der Kapillarlänge unter Hyperglykämie; allerdings bei einer signifikant geringeren Anzahl von Verknüpfungspunkten unter hyperglykämischen Bedingungen. Auch der Quotient aus Verknüpfungspunkten und Kapillarlänge und die semiquantitative Punktevergabe zur Komplexität des Kapillarnetzwerkes waren im Vergleich zu normoglykämischen Bedingungen signifikant erniedrigt, sodass sich zusammenfassend eine signifikant weniger komplexe Angiogenese unter Hyperglykämie zeigte.

Um zu prüfen inwieweit dies durch den osmotischen Einfluss der Glukose zustande kommt, dienten additiv zu den vorhandenen 5 mmol/l D-Glukose 15 mmol/l L-Glukose (OK) im Versuchsmedium. Hierbei fand sich, dass die osmotische Kontrolle zu keinen Veränderungen gegenüber den normoglykämischen Zellen führte, so dass ein Einfluss des osmotischen Druckes hierdurch unwahrscheinlich erscheint.

Als nächstes sollte geprüft werden, ob der Glukoseeffekt davon abhängig ist, dass die Glukose metabolisiert wird. Dazu wurde ein Monosaccharid appliziert, welches zwar die Zellmembran passiert jedoch nicht weiter durch die Glykolyse verstoffwechselt wird: Es wurden zusätzlich 15 mmol/l 3-*O*-Methyl-D-Glukose im Kulturmedium verwendet (OMD). Unter Inkubation mit OMD zeigte sich, wenn auch weniger stark ausgeprägt, die gleiche signifikante Erniedrigung der erhobenen Angiogeneseparameter Anzahl der Verknüpfungspunkte, dem Quotienten aus Verknüpfungspunkten und Kapillarlänge, sowie dem Muster des Kapillarnetzwerkes wie unter Hyperglykämie durch D-Glukose.

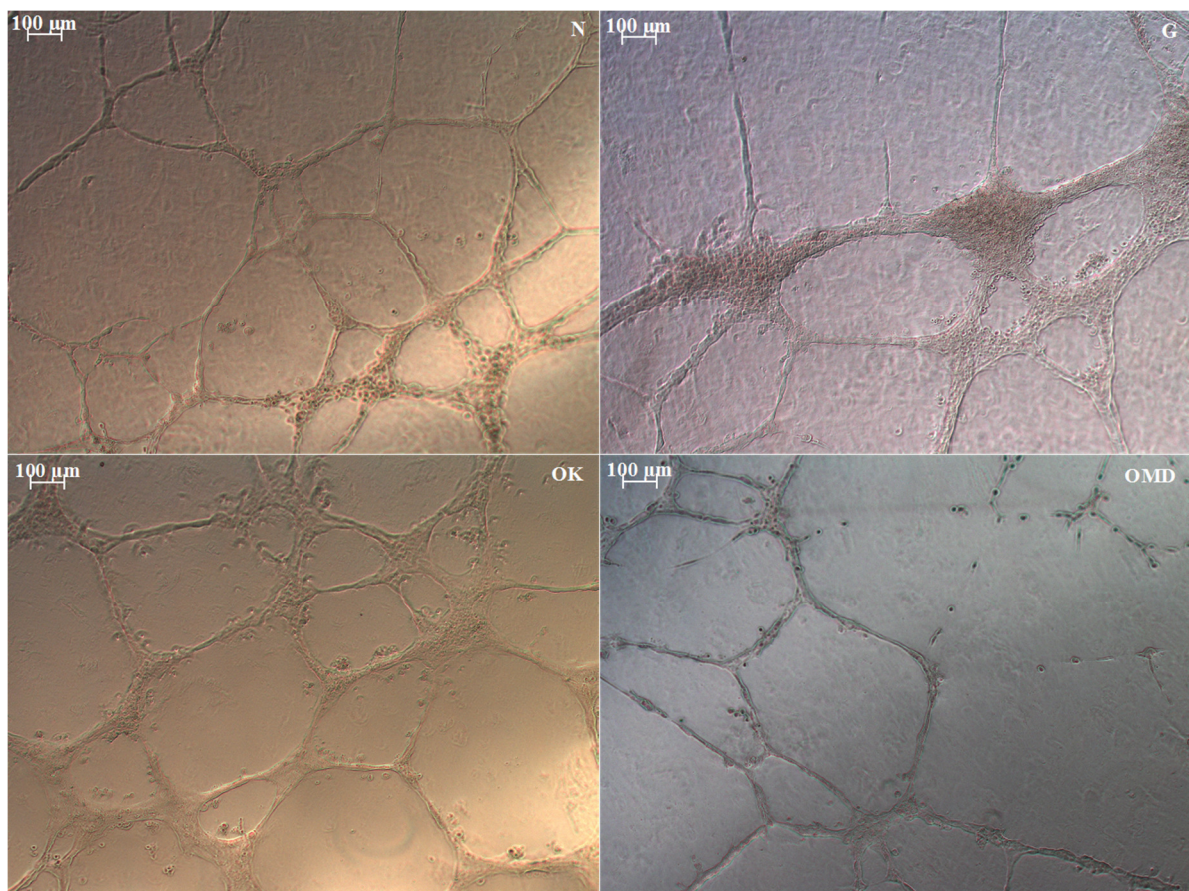


Abbildung 6: Der Effekt auf das Kapillarwachstum N, G, OK, OMD *in vitro* Angiogeneseassays.

HUVECs wuchsen bis zur Konfluenz auf Zellkulturplatten und anschließend für 12–14 h in das Matrigel des Angiogeneseassays ein.

Das Wachstum fand in versuchsgruppenspezifischen Medien statt: 5 mmol/l D-Glukose (N); 20 mmol/l D-Glukose (G); plus 15 mmol/l L-Glukose (OK); plus 15 mmol/l 3-*O*-Methyl-D-Glukose (OMD).

Im Anschluss wurden repräsentative Phasenkontrastaufnahmen durchgeführt.

Maßstabsbalken = 100 µm.

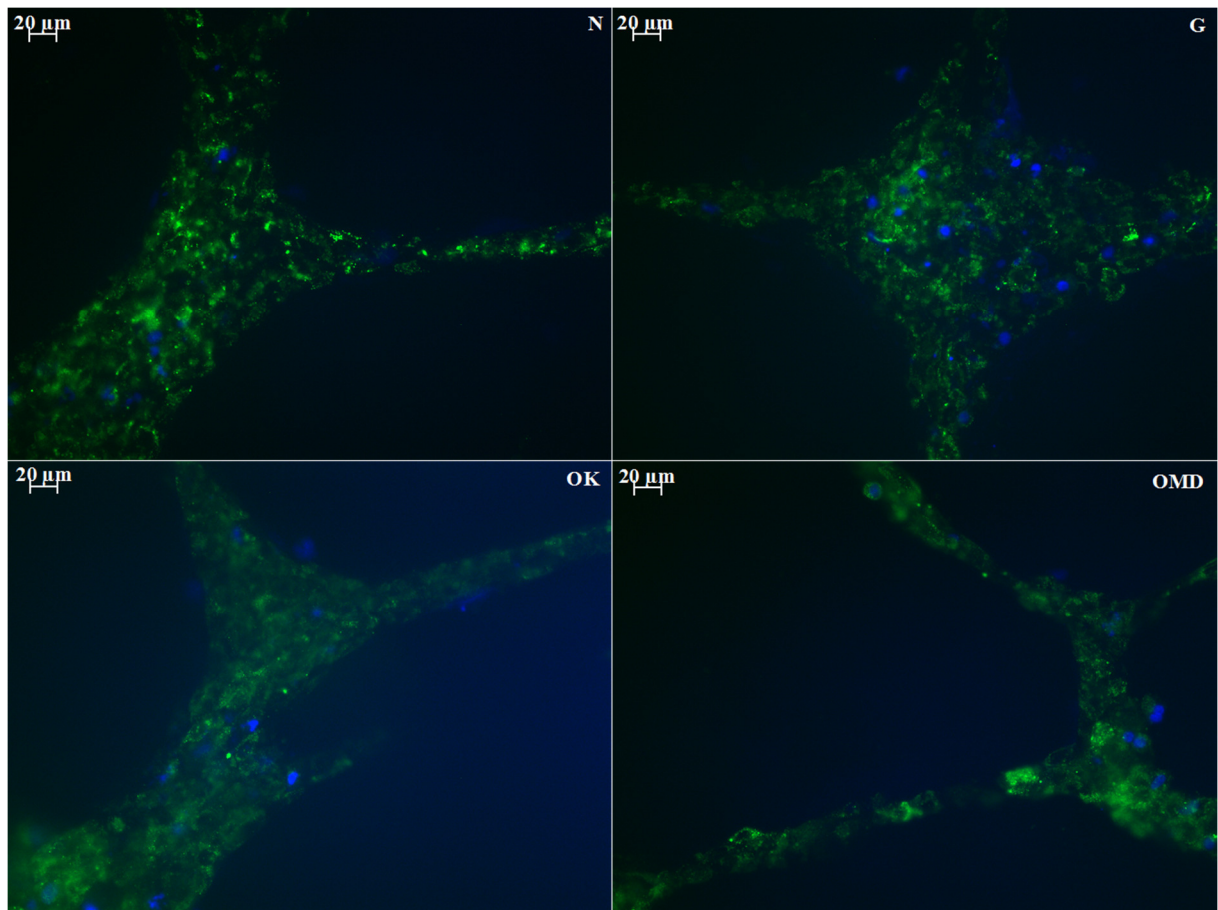


Abbildung 7: Einfluss auf die Zellzahl *in vitro*

Um im Folgenden die Kapillaren darzustellen, wurden die Endothelzellen vor dem Angiogeneseassay mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC (grün) gefärbt. Zur Darstellung der Zellkerne, wurden die Zellen nach dem Angiogeneseassay mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (blau) gefärbt, sodass eine Ermittlung der Zellzahl möglich wurde.

Das Wachstum fand in versuchsgruppenspezifischen Medien statt: 5 mmol/l D-Glukose (N); 20 mmol/l D-Glukose (G); plus 15 mmol/l L-Glukose (OK); plus 15 mmol/l 3-O-Methyl-D-Glukose (OMD).

Maßstabsbalken = 20µm.

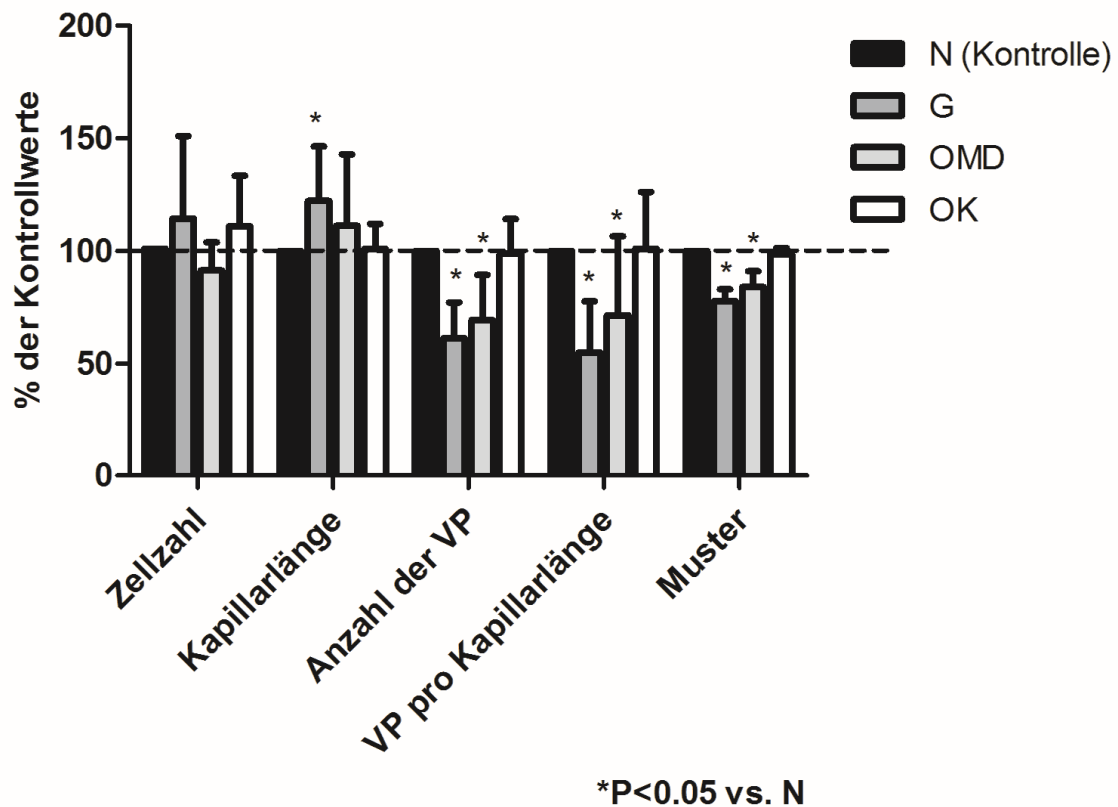


Abbildung 8: Auswirkungen von Stoffwechselveränderungen auf die Angiogenese

Quantitative Erfassung der Zellzahl, Kapillarlänge, der Anzahl von Verknüpfungspunkten (VP), dem Quotienten aus Verknüpfungspunkten und Kapillarlänge und semiquantitativ dem Muster des Kapillarnetzwerkes.

Die Angaben entsprechen den Mittelwerten \pm S.E.M aus 6 Versuchen.

Normoglykämische Kontrolle (N) = 100 % = ----

Signifikante Unterschiede zur Kontrolle (N) wurden mit einem Stern* gekennzeichnet.

Das Wachstum fand in versuchsgruppenspezifischen Medien statt: 5 mmol/l D-Glukose (N); 20 mmol/l D-Glukose (G); plus 15 mmol/l L-Glukose (OK); plus 15 mmol/l 3-O-Methyl-D-Glukose (OMD).

	Zellzahl/ mm ²	Kapillar- länge	Anzahl der VP	VP pro Kapillar- länge	Muster
Normoglykämie	742,9 \pm 47,11	197,99 \pm 5,94	45,08 \pm 2,26	0,26 \pm 0,02	4,87 \pm 0,04
Hyperglykämie	807,57 \pm 50,92	236,75 \pm 8,36*	26,3 \pm 1,22*	0,12 \pm 0,01*	3,79 \pm 0,06*
3-O-Methyl-D-Glukose	675,05 \pm 50,94	212,49 \pm 7,7	29,57 \pm 1,5*	0,16 \pm 0,01*	4,09 \pm 0,08*
Osmotische Kontrolle	806,6 \pm 45,21	198,53 \pm 5,9	43,18 \pm 1,82	0,24 \pm 0,02	4,81 \pm 0,04

Tabelle 1: Angiogeneseassay mit HUVEC; Mittelwerte \pm SEM, *p<0,05

5.3. Der Effekt von Salbutamol unter normoglykämischen Bedingungen auf die Angiogenese

Um zunächst zu klären, welchen Effekt Salbutamol unter normoglykämischen Bedingungen besitzt, wurde die normoglykämische Kontrollgruppe (N) mit einer normoglykämischen Versuchsguppe plus 20 nmol/l Salbutamol verglichen (N+S).

Dabei zeigte Salbutamol keinen signifikanten Effekt auf die Angiogenese. Allein im Bezug auf die Zellzahl, zeigte Salbutamol einen anabolen Effekt mit signifikanter Zunahme der Zellzahl.

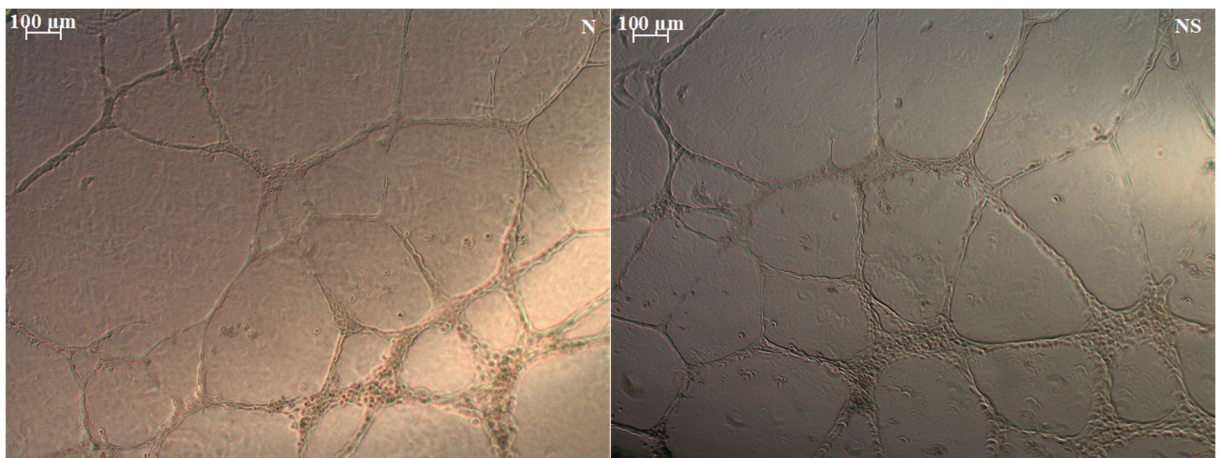


Abbildung 9: Der Effekt auf das Kapillarwachstum N und NS *in vitro* Angiogeneseassays.

HUVECs wuchsen bis zur Konfluenz auf Zellkulturplatten und anschließend für 12–14 h in das Matrigel des Angiogeneseassays ein.

Das Wachstum fand in versuchsgruppenspezifischen Medien statt: 5 mmol/l D-Glukose (N), normoglykämisches Medium plus 20 nmol/l Salbutamol (NS).

Im Anschluss wurden repräsentative Phasenkontrastaufnahmen durchgeführt.

Maßstabsbalken = 100 µm.

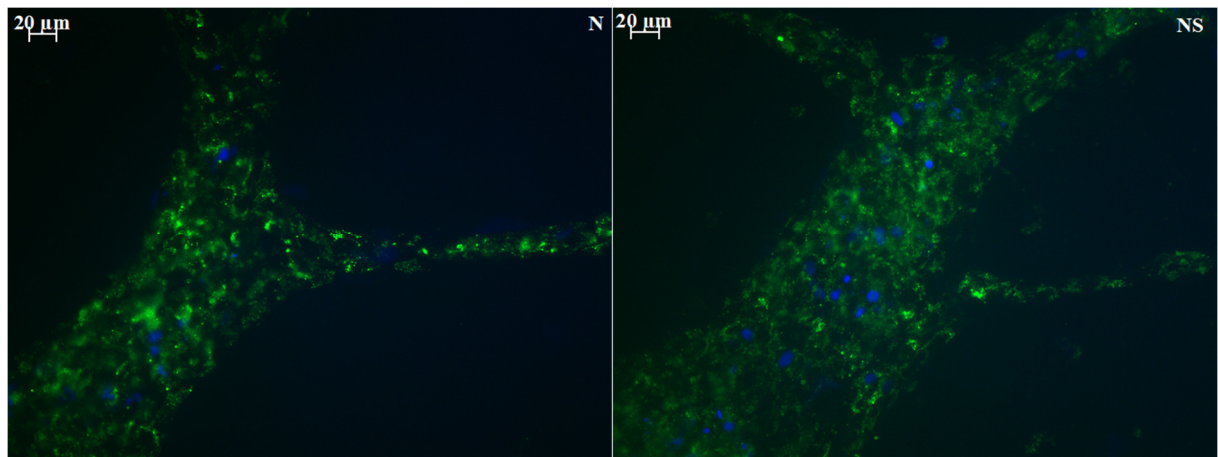


Abbildung 10: Einfluss auf die Zellzahl *in vitro*

Um im Folgenden die Kapillaren darzustellen, wurden die Endothelzellen vor dem Angiogeneseassay mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC (grün) gefärbt. Zur Darstellung der Zellkerne, wurden die Zellen nach dem Angiogeneseassay mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (blau) gefärbt, sodass eine Ermittlung der Zellzahl möglich wurde.

Das Wachstum fand in versuchsgruppenspezifischen Medien statt: 5 mmol/l D-Glukose (N), normoglykämisches Medium plus 20 nmol/l Salbutamol (NS).

Maßstabsbalken = 20 μm .

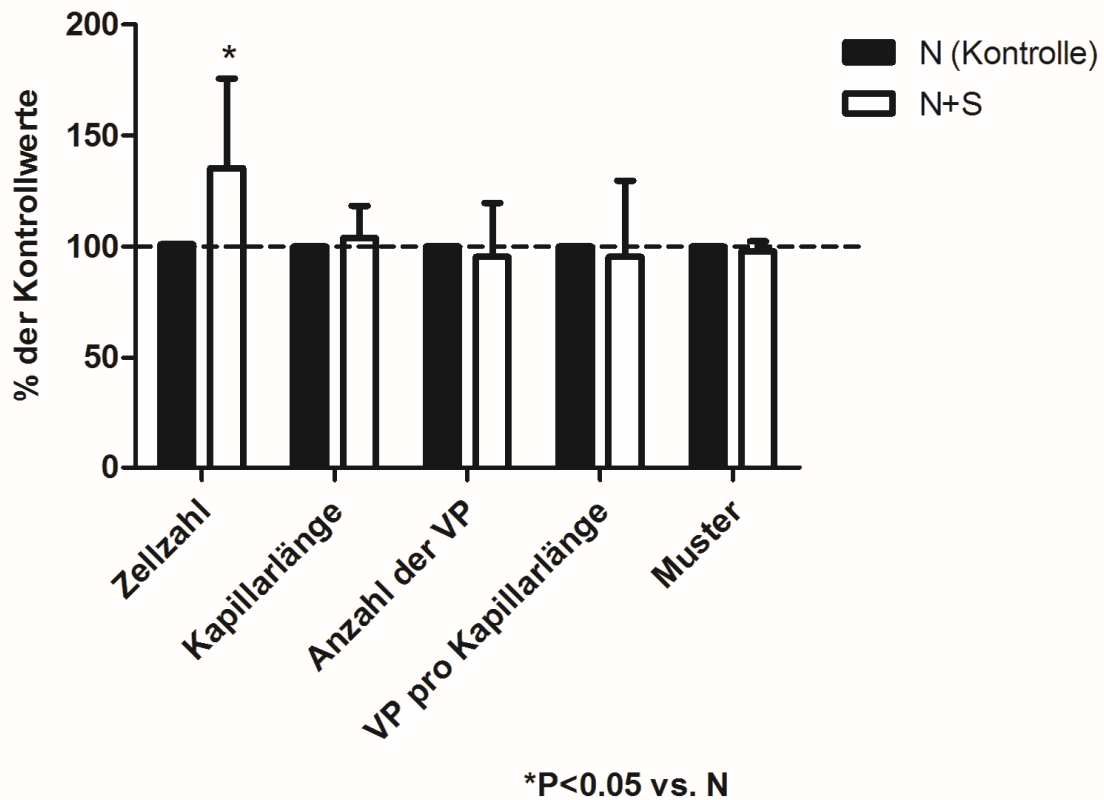


Abbildung 11: Der Effekt von Salbutamol auf die Angiogenese unter normoglykämischen Bedingungen

Quantitative Erfassung der Zellzahl, Kapillarlänge, der Anzahl von Verknüpfungspunkten (VP), dem Quotienten aus Verknüpfungspunkten und Kapillarlänge und semiquantitativ dem Muster des Kapillarnetzwerkes.

Die Angaben entsprechen den Mittelwerten \pm S.E.M aus 6 Versuchen.

Normoglykämische Kontrolle (N) = 100 % = ----

Signifikante Unterschiede zur Kontrolle (N) wurden mit einem Stern* gekennzeichnet.

Das Wachstum fand in versuchsgruppenspezifischen Medien statt: 5 mmol/l D-Glukose (N), normoglykämisches Medium plus 20 nmol/l Salbutamol (NS).

	Zellzahl/ mm ²	Kapillar- länge	Anzahl der VP	VP pro Kapillar- länge	Muster
Normo- glykämie	742,9 \pm 47,11	197,99 \pm 5,94	45,08 \pm 2,26	0,26 \pm 0,02	4,87 \pm 0,04
Normo- glykämie + Salbutamol	972,37 \pm 73,03*	202,22 \pm 5,41	41,7 \pm 2,04	0,23 \pm 0,02	4,77 \pm 0,06

Tabelle 2: Angiogeneseassay mit HUVEC; Mittelwerte \pm SEM, *p<0,05

5.4. Der Effekt von Salbutamol und Bisindolylmaleimid 1 unter hyperglykämischen Bedingungen auf die Angiogenese

Um zu prüfen, ob sich das durch Hyperglykämie hervorgerufene Angiogenesedefizit antagonisieren lässt, wurden die Endothelzellen unter hyperglykämischen Bedingungen zusätzlich mit 20 nmol/l des selektiven β_2 -Agonisten Salbutamol (G+S) oder mit 2 μ mol/l des Proteinkinase-C-Inhibitors Bisindolylmaleimid 1 (G+BIM) behandelt. Dabei zeigten sich unter Behandlung mit Salbutamol und insbesondere Bisindolylmaleimid 1 jeweils eine signifikante Normalisierung der beiden Angiogeneseparameter Anzahl der Verknüpfungspunkte, dem Quotienten aus Verknüpfungspunkten und Kapillarlänge, sowie dem Muster des Kapillarnetzwerkes verglichen mit alleiniger Hyperglykämie, wobei dieser Effekt für Bisindolylmaleimid 1 etwas stärker ausgeprägt war.

Zudem zeigte sich unter Bisindolylmaleimid 1 (G+BIM) im Vergleich zur hyperglykämischen Versuchsgruppe (G) eine signifikante Abnahme der Kapillarlänge und der Zellzahl. Salbutamol und Bisindolylmaleimid 1 konnten somit den negativen Effekt der Hyperglykämie auf die Angiogenese teilweise aufheben.

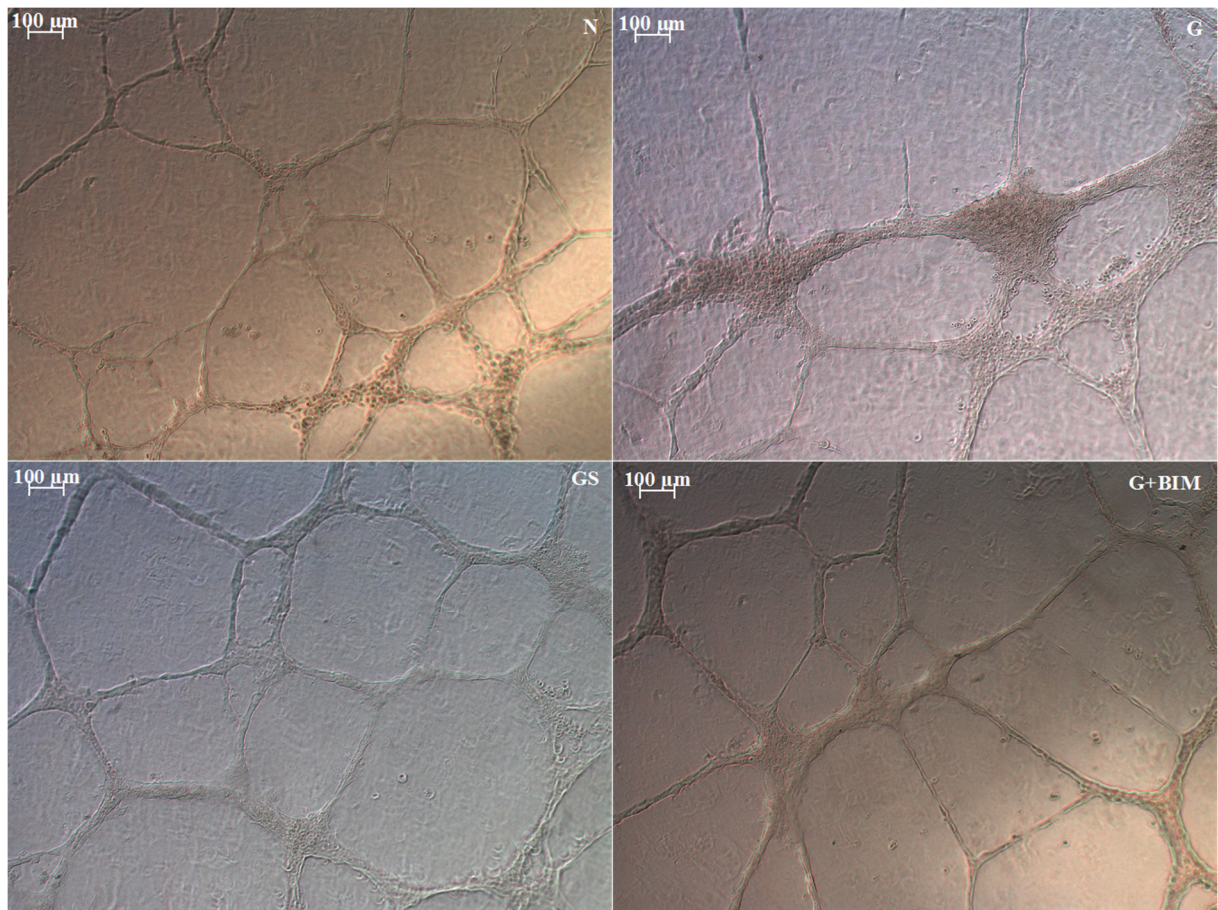


Abbildung 12: Der Effekt auf das Kapillarwachstum N, G, GS und G+BIM *in vitro* Angiogeneseassays.

HUVECs wuchsen bis zur Konfluenz auf Zellkulturplatten und anschließend für 12–14 h in das Matrigel des Angiogeneseassays ein.

Das Wachstum fand in versuchsgruppenspezifischen Medien statt: 5 mmol/l D-Glukose (N); 20 mmol/l D-Glukose (G); 20 mmol/l D-Glukose plus 20 nmol/l Salbutamol (GS); 20 mmol/l D-Glukose plus 2 μmol/l Bisindolylmaleimid 1 (G+BIM).

Im Anschluss wurden repräsentative Phasenkontrastaufnahmen durchgeführt.

Maßstabsbalken = 100 μm.

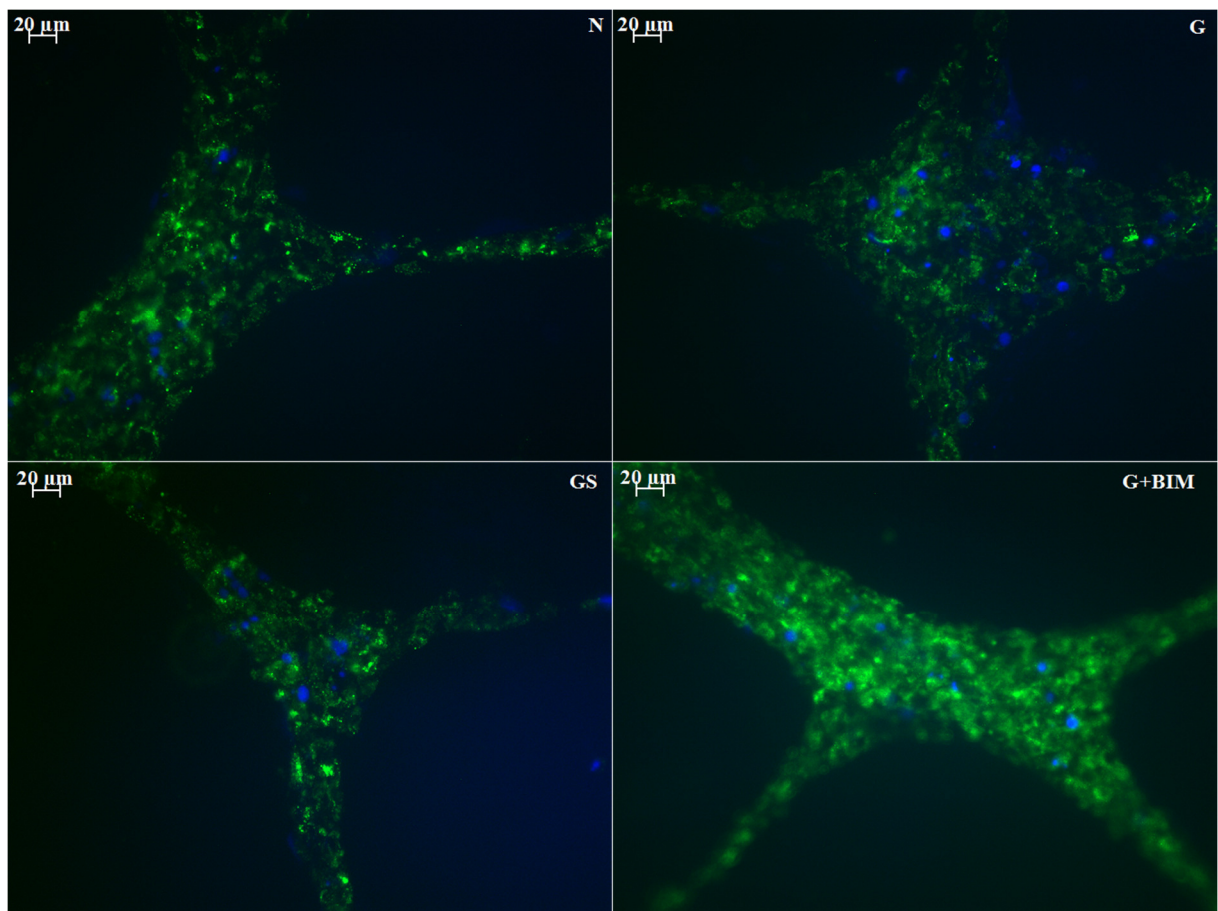
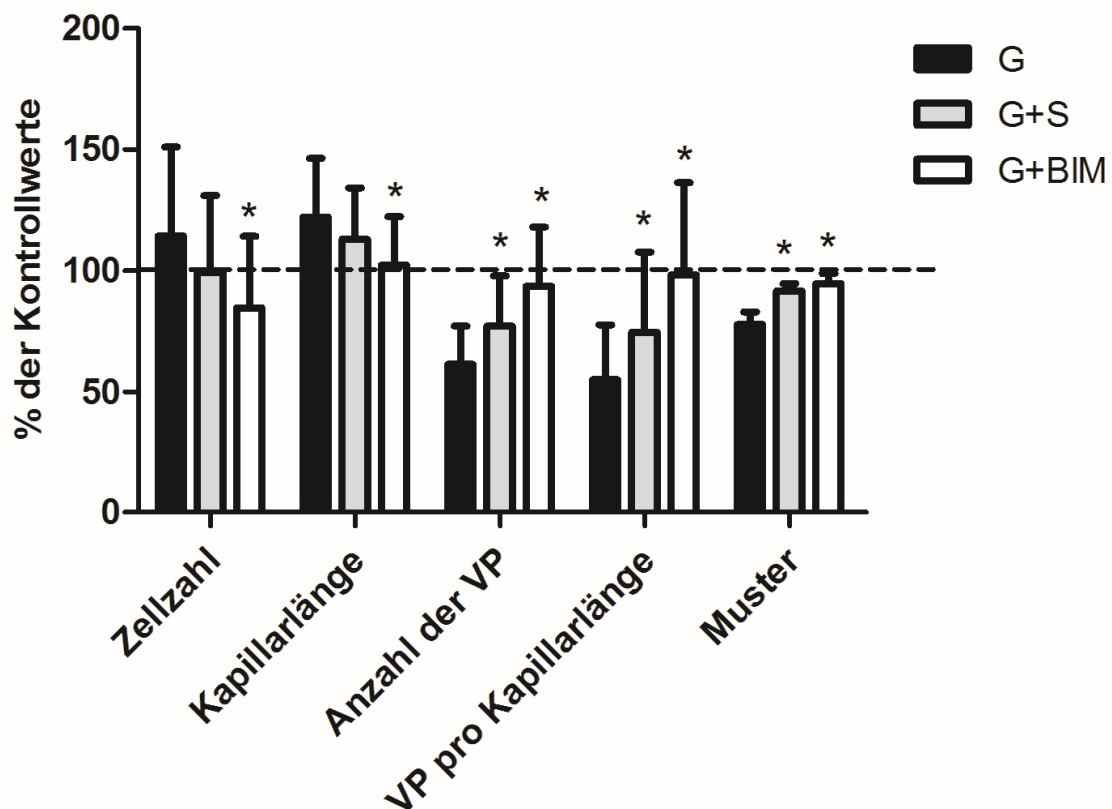


Abbildung 13: Einfluss auf die Zellzahl *in vitro*

Um im Folgenden die Kapillaren darzustellen, wurden die Endothelzellen vor dem Angiogeneseassay mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC (grün) gefärbt. Zur Darstellung der Zellkerne, wurden die Zellen nach dem Angiogeneseassay mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (blau) gefärbt, sodass eine Ermittlung der Zellzahl möglich wurde.

Das Wachstum fand in versuchsgruppenspezifischen Medien statt: 5 mmol/l D-Glukose (N); 20 mmol/l D-Glukose (G); 20 mmol/l D-Glukose plus 20 nmol/l Salbutamol (GS); 20 mmol/l D-Glukose plus 2 μmol/l Bisindolylmaleimid 1 (G+BIM).

Maßstabsbalken = 20μm.



*P<0.05 vs. G

Abbildung 14: Der Effekt von Salbutamol und Bisindolylmaleimid 1 unter hyperglykämischen Bedingungen

Quantitative Erfassung der Zellzahl, Kapillarlänge, der Anzahl von Verknüpfungspunkten (VP), dem Quotienten aus Verknüpfungspunkten und Kapillarlänge und semiquantitativ dem Muster des Kapillarnetzwerkes.

Die Angaben entsprechen den Mittelwerten \pm S.E.M aus 6 Versuchen.

Normoglykämische Kontrolle (N) = 100 % = ----

Signifikante Unterschiede zur Versuchsgruppe(G) wurden mit einem Stern* gekennzeichnet.

Das Wachstum fand in versuchsgruppenspezifischen Medien statt: 5 mmol/l D-Glukose (N); 20 mmol/l D-Glukose (G); 20 mmol/l D-Glukose plus 20 nmol/l Salbutamol (GS); 20 mmol/l D-Glukose plus 2 μ mol/l Bisindolylmaleimid 1 (G+BIM).

	Zellzahl/ mm²	Kapillar- länge	Anzahl der VP	VP pro Kapillar- länge	Muster
Hyper- glykämie	807,57 ± 50,92	236,75 ± 8,36*	26,3 ± 1,22*	0,12 ± 0,01*	3,79 ± 0,06*
Hyper- glykämie + Salbutamol	705,49 ± 43,9	219,13 ± 6,77	33,63 ± 1,81*	0,17 ± 0,01*	4,47 ± 0,06*
Hyper- glykämie + BIM	636,91 ± 59,22*	199,04 ± 5,91*	40,18 ± 2,07*	0,23 ± 0,02*	4,61 ± 0,05*

Tabelle 3: Angiogeneseassay mit HUVEC; Mittelwerte ± SEM, *p<0,05

6. Diskussion der verwendeten Methoden

6.1. Zellkultur

Für die Versuche wurden primäre Zellkulturen endothelialer Zellen aus der Nabelschnurvene, sogenannte HUVEC (Humane umbilikale Endothelzellen), verwendet.

Primäre Zellkulturen werden aus frisch isolierten Zellen angezüchtet. Als Vorteil bei Primärzellen erweist sich, dass sie am wenigsten verändert sind und deshalb den Bedingungen des Organismus am nächsten kommen. So behalten sie *in vitro* gewöhnlich die meisten Eigenschaften und Charakteristika bei, durch die sie auch *in vivo* gekennzeichnet sind (Aird 2012). Allerdings muss ihre limitierte Lebensdauer unter *in vitro* Bedingungen berücksichtigt werden, denn im Kulturverlauf kommt es zur Verringerung der Zellteilungsrate und zum Eintreten der Seneszenz. Diese Beobachtungen wurden bereits von Leonard Hayflick Anfang der 1960er-Jahre für die Kultur von primären Fibroblasten unter dem sogenannten Hayflick-Phänomen beschrieben. Primäre adhärente Zellkulturen zeigen eine zelldichteabhängige Proliferationshemmung, sogenannte Kontaktinhibition, die zur Verringerung der Zellteilungsrate führt. Larson u. a. konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass die Expression der Gap junction Proteine Connexin 43 und 37 abhängig vom Wachstumsstatus (subkonfluent oder konfluent) beziehungsweise von der Zelldichte ist (Larson u. a. 1997).

Immortalisierte Zellen hingegen stellen entweder Tumorzellen oder gentechnisch transformierte Zellen dar, welche die Fähigkeit zur Kontaktinhibition verloren haben und so potenziell dauerhaft kultiviert werden können. Neben dem Vorteil der unbegrenzten Teilungsfähigkeit haften der Immortalisierung von Zellen jedoch auch Probleme an. Permanente Zellkulturen verändern ihre Genexpression, sodass die Zellen bei wiederholter Passage phänotypische Veränderungen durchmachen dürften und nur noch wenige der ursprünglichen *in vivo* Charakteristika aufweisen (Nisato u. a. 2004).

Daher wurden primäre Zellkulturen verwendet, welche nicht älter als Passage 3 waren (siehe Methodenteil). Insbesondere HUVEC zeichnen sich durch eine geringe Passagierbarkeit aus, die wahrscheinlich in der fehlenden physiologischen Funktion der Nabelschnurvene nach der Geburt begründet liegt.

Wichtig hervorzuheben ist auch der fetale Ursprung der Zellen, was Berücksichtigung bei der Übertragung der Ergebnisse auf den adulten Organismus finden muss. Ein Vorteil der Verwendung von fetalen Zellen sind die geringen Einflüsse durch Vorschäden des Endothels oder die Vorbehandlung mit Medikamenten.

Im Bezug auf die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen, spielt der humane Ursprung der Zellen eine wichtige Rolle.

Im Vergleich zu anderem menschlichen Gewebe ist vorteilhaft, dass ist die Nabelschnur als ein Abfallprodukt nach der Geburt relativ kostengünstig und mit den ethischen Konventionen leicht vereinbar zu beschaffen ist.

Darüberhinaus stellen HUVEC seit vielen Jahren ein etabliertes Zellkulturmodell dar. Sie lassen sich unter standardisierten Bedingungen seit 1973 erfolgreich kultivieren (Jaffe u. a. 1973). So zeigen sie bereits nach 4 ± 1 Tagen eine 80 %ige Konfluenz, welche an einem typischen pflastersteinartigen Aussehen zu erkennen ist, während sie noch zuvor bei Subkonfluenz eine eher fibroblastenähnliche Morphologie aufweisen (Schmitz, 2011).

Die Versuche wurden bei 80 %iger Subkonfluenz durchgeführt, da Zell-Zell-Kontakt wie oberhalb beschrieben zur Inhibition der Teilung führt und sich folglich mit zunehmendem Konfluenzgrad auch die Fähigkeit zur Angiogenese vermindert (Staton u. a. 2009).

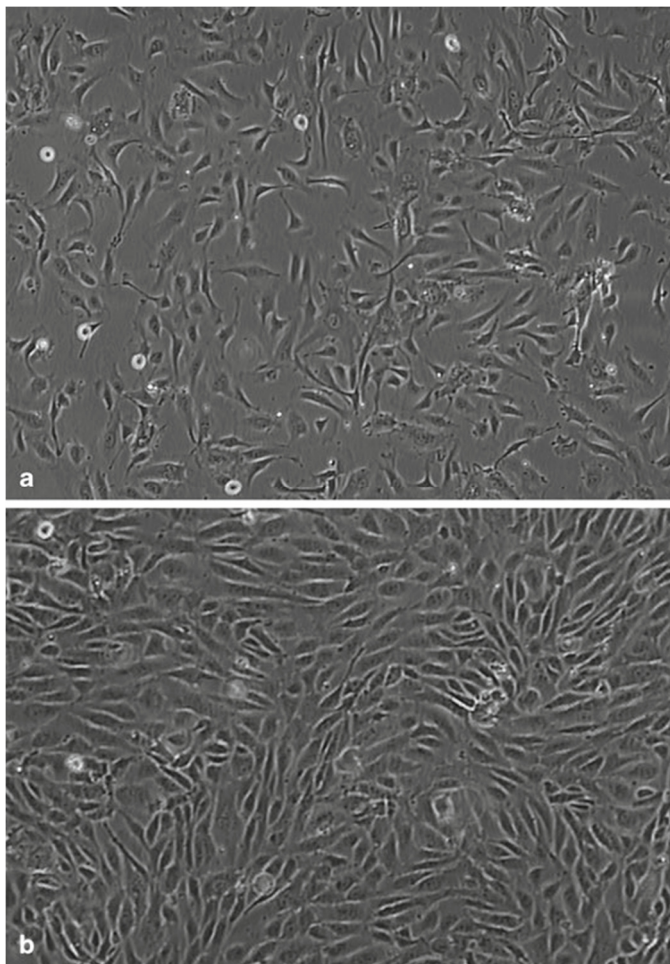


Abbildung 15: Humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC)

a) Bei 50 % Konfluenz mit fibroblastenähnlicher Morphologie (100-fache Vergrößerung)

b) Bei 100 % Konfluenz mit typischen Kopfsteinpflaster-Muster (100-fache Vergrößerung)

Abbildungen a und b entstammen dem Buch „Der Experimentator: Zellkultur.“ (Schmitz, 2011)

Eine weitere Besonderheit der HUVEC ist, dass sie embryonal gesehen venös sind, jedoch von der Fließrichtung her arteriell, sodass kein typischer venöser Druck in diesem Gefäßsystem herrscht. In diesem Fall wäre die Verwendung eines humanen, nicht mit Medikamenten vorbehandelten, frischen und jungen Kapillarendothels optimal gewesen, welches jedoch nicht ohne Weiteres verfügbar ist.

6.2. Angiogeneseassay

Um die Angiogenese zu untersuchen, wurde ein Tube formation assay oder auch sogenanntes Endothelzellen-Differenzierungs Assay verwendet. Hierbei werden die Endothelzellen auf eine extrazelluläre Matrix (Matrigel) gegeben und die Gefäßbildung über die Zeit beobachtet (Irvin u. a. 2014).

Das Matrigel ist ein Gemisch aus extrazellulären und Basalmembran-Proteinen, sowie verschiedenen Wachstumsfaktoren, gewonnen aus Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)-Tumoren, deren Hauptkomponente Laminin ist (Grant u. a. 1994). In diesem Matrigel konnten die ausgesähten Endothelzellen innerhalb von 12–14 Stunden kapillarähnliche Strukturen oder bis hin zu einem Kapillarnetz entwickeln.

Das Matrigel ist allerdings eine spezielle extrazelluläre Matrix, welche in dieser Form *in vivo* nicht gegeben ist. Ein Vorteil ist jedoch, dass es sich hierbei um eine weit verbreitete kommerzielle und standardisierte Zusammensetzung von Wachstumsfaktoren und Extrazellulärmatrix handelt.

Ähnlich verhält es sich mit dem verwendeten Zell-Kulturmedium. Einerseits ist nicht auszuschließen, dass es durch das verwendete Kulturmedium und den darin enthaltenden Wachstumsfaktoren und fetalem Kälberserum zu einer Enzyminduktion, Aktivierung von Signalwegen oder Freisetzung von Chemokinen gekommen ist. Andererseits sind mithilfe des Kulturmediums standardisierte Bedingungen schaffbar, die sich gut an den Bedingungen *in vivo* im Bezug auf Temperatur, Nährstoffversorgung und Wachstumsfaktoren orientieren. Zudem wurde regelmäßig das Zellkulturmedium gewechselt, da mit zunehmenden Konfluenzgrad Nährstoffangebot und PH-Wert sinken (Staton u. a. 2009).

In vivo spielt jedoch auch das periphere Gewebe als Modulator des Sauerstoffverbrauchs eine wichtige Rolle. Wenn die Sauerstoffnachfrage innerhalb eines Gewebes das Angebot übertrifft, führt dies zur Aktivierung von Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1), der die Transkription von VEGF (Vascular endothelial cell growth factor) als zentralem proangiogenetischem Faktor und anderen Hypoxie-sensitiven Genen fördert (Yamakawa u. a. 2003; Germain u. a. 2010).

Die Modulation des Sauerstoffverbrauchs durch das periphere Gewebe ist *in vitro* in dieser Form nicht gegeben.

Insgesamt fehlt *in vitro* die physiologische Umgebung mit zahlreichen Aktivatoren der Angiogenese wie glatten Muskelzellen, Perizyten und Fibroblasten, der immunologischen Antwort, extrazellulärer Matrix und auch dem zirkulierenden Blut und damit verbundenen shear stress (Staton u. a. 2009; Irvin u. a. 2014).

Insbesondere shear stress erhöht die eNOS-Aktivität durch Phosphorylierung mit einem damit assoziierten Anstieg der NO-Konzentration (Kanai u. a. 1995; Corson u. a. 1996; Fisslthaler u. a. 2000), welcher bedeutsam für die Angiogenese ist (siehe Abschnitt „Endotheliale Dysfunktion, verminderte NO-Bioverfügbarkeit und die eingeschränkte Angiogenese“ Seite 60).

Die Versuche des Angiogeneseassays wurden nicht unter Perfusion durchgeführt und auch die neu gebildeten Kapillaren waren nicht perfundiert, sodass die Gefäßwandspannung durch shear stress, der einen fördernden Einfluss auf die Apoptosehemmung und Angiogenese hat, in diesem Fall nicht integriert war (Brown, u. a. 2003; S Dimmeler, Hermann, u. a. 1999).

Zudem ist die Erkrankung Diabetes mellitus eine Systemerkrankung mit zahlreichen an der Erkrankung beteiligten Faktoren des Gesamtorganismus. In dieser Arbeit wurde jedoch nur der alleinige Einflussfaktor der Hyperglykämie untersucht.

Letztendlich hängen die Ausbildung von Kapillaren und die Komplexität des Netzwerkes von zahlreichen Faktoren wie der eingesetzten Zelldichte, Dauer des Angiogeneseassays, Wachstumsfaktoren und dem Passagealter der Zellen ab (Arnaoutova u. a. 2009). Diese Parameter lassen sich beim *in vitro* Angiogeneseassay leicht konstant halten, sodass eine gute Standardisierung erreichbar ist.

Zudem ermöglichte die Mitfuhr einer Kontrollgruppe, die Ermittlung der relativen Angiogeneseparameter.

Auch wenn das *In vitro* Angiogenese Assay Kit in erster Linie als qualitatives Assay entworfen wurde, ist es dennoch möglich in einem gewissen Ausmaß den Grad des gebildeten zellulären Netzwerkes zu quantifizieren; siehe Punktesystem in Abbildung: 3 (Gärtner u. a. 2012; Dhein u. a. 2015).

Wichtig zu beachten ist, dass die Darstellung des komplexen Ablaufs der Angiogenese im *in vitro* Modell des verwendeten Tube formation assays nur einen Ausschnitt aus dem Gesamtprozesses darstellt. Repräsentativ ist das Assay in erster Linie für die späteren Stadien der Angiogenese, der Ausdifferenzierung mit Bildung kapillarähnlicher Strukturen, meist aber ohne die Schritte der vaskulären Reifung (Staton u. a. 2009; Irvin u. a. 2014).

Trotz ihrer Mängel an Komplexität liefern *in vitro* Angiogeneseassays jedoch eine sehr gute Reproduzierbarkeit und Möglichkeit der Standardisierung von pro- oder antiangiogenetischen Faktoren, da sie isoliert sind von Einflussfaktoren des gesamten Organismus, während *in vivo* Angiogeneseassays eher limitiert sind im Bezug auf die Untersuchung einzelner Variablen (Irvin u. a. 2014).

Somit sind *in vitro* Assays für die präklinische Evaluierung von potentiellen pro- oder antiangiogenetischen Faktoren verwendbar. Allerdings ist es essentiell *in vitro* assays durch nachfolgende *in vivo* assays zu validieren.

Die Grenzen jeden Assays sollten dabei berücksichtigt werden, um eine Überinterpretation der Ergebnisse zu vermeiden (Staton u. a. 2009).

6.3. Simulation des Diabetes mellitus im Zellkulturmodell

Zahlreiche Studien gipfelnd in die *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) beim Typ I Diabetes und die *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS) beim Typ II Diabetes haben gezeigt, dass Hyperglykämie und fehlende Blut-Glukose-Kontrolle eine der Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung mikrovaskulärer Komplikationen beim Diabetes mellitus sind (Holman u. a. 2008; The Diabetes Control and Complications Trial Research Group 1993; UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group 1998).

Zahlreiche der Komplikationen des Diabetes mellitus sind dabei mit dysfunktionaler Angiogenese verknüpft, die sich sowohl in einer übermäßigen, aber pathologischen Angiogenese wie bei diabetischer Angiopathie, Nephropathie und Retinopathie, als auch in einer verringerten Angiogenese wie bei beeinträchtigter Wundheilung, diabetischer peripherer Neuropathie, verminderter kollateraler Koronargefäßentwicklung als Antwort auf Ischämie, embryonalen Vaskulopathien beim Schwangerschaftsdiabetes und häufigeren Transplantatabstoßungen bei Diabetespatienten zeigen kann (Martin u. a. 2003; Obrosova 2009).

Schwerpunkt dieser Arbeit liegt insbesondere auf der beeinträchtigten Angiogenese, wie bei den eigenen Versuchen unter Hyperglykämie beobachtet.

Um die dysfunktionale Angiogenese beim Krankheitsbild des Diabetes mellitus zu untersuchen, wurde zunächst ein Zellkulturmodell zur Hyperglykämie-induzierten Langzeitschäden an HUVEC etabliert (siehe Methodenteil). Dabei wurden die Endothelzellen die gesamte Dauer einer Kulturpassage bis zur 80 %igen Konfluenz mit 20 mmol/l D-Glukose behandelt.

Dies entsprechen 400 mg/dl *in vivo* und simuliert somit chronische Hyperglykämie (Salameh & Dhein 1998). Andere Parameter des metabolischen Syndroms konnten in dieses Zellkulturmodell allerdings nicht integriert werden, sodass nur der ausschließliche Effekt der D-Glukose auf die Angiogenese untersucht wurde.

7. Diskussion der Ergebnisse

7.1. Effekte der Hyperglykämie auf die Angiogenese

Chronische Exposition der HUVEC-Kulturen gegenüber erhöhten D-Glukosewerten führte zu einer signifikant beeinträchtigten Angiogenese. Es ist anzunehmen, dass Hyperglykämie, wie auch schon in vorhergehenden Arbeiten untersucht, die Endothelfunktion (Kabat & Dhein 2006) und im Speziellen auch die Fähigkeit des Endothels zur Angiogenese einschränkt (Yu u. a. 2006).

Dieser Effekt zeigte sich allerdings nicht bei der L-Glukose, sodass der durch dieses Monosaccharid extrazellulär erzeugte osmotische Druck nicht ursächlich sein kann. Die Hyperosmolarität hat offenbar keinen Einfluss auf den intrazellulären Stoffwechsel bezüglich der Angiogenese. Das heisst, dass die Ursache der beeinträchtigten Angiogenese nicht extrazellulär, sondern intrazellulär begründet liegen muss.

Erhöhte 3-O-Methyl-D-Glukose-Konzentrationen führten in den eigenen Versuchen wie auch die Hyperglykämie durch D-Glukose ebenfalls zu einer beeinträchtigten Angiogenese.

Als Glukoseanalogon überwindet 3-O-Methyl-D-Glukose die Zellmembran und wird wie auch die D-Glukose durch die Hexokinase phosphoryliert (Malaisse-Lagae u. a. 1986), jedoch nicht weiter über die Glykolyse metabolisiert. Du u. a. konnten an unter D-Glukose oder 3-O-Methyl-D-Glukose kultivierten HUVEC zeigen, dass die 3-O-Methyl-D-Glukose in einem ähnlichen Umfang wie die D-Glukose zu einer Zunahme apoptotischer Zellen und DNA-Fragmentierung führt. Eine Inkubation mit Superoxiddismutase, konnte diese Veränderung im Vergleich zu normoglykämischen Bedingungen rückgängig machen, sodass vermutlich die durch 3-O-Methyl-D-Glukose verursachte intrazelluläre Freisetzung von freien Radikalen in die Zellschädigungsprozesse involviert ist (Du u. a. 1998). Dies weist darauf hin, dass nicht nur die D-Glukose selbst durch ihre intrazelluläre Metabolisierung, sondern auch die 3-O-Methyl-D-Glukose, unabhängig von glykolytischen Signalwegen, für die Induktion einer Zellschädigung verantwortlich ist.

7.2. Endotheliale Dysfunktion, verminderte NO-Bioverfügbarkeit und eingeschränkte Angiogenese

Endotheliale Dysfunktion ist eine der häufigsten Eigenschaften bei diabetischen Patienten (Dogra u. a. 2001) und trägt maßgeblich zu deren kardiovaskulärer Morbidität bei (Schächinger u. a. 2000; Suwaidi u. a. 2000).

Durch die konstitutiv exprimierte NO-Synthase (eNOS oder NOS3) bilden Endothelzellen aus der Aminosäure L-Arginin und molekularem Sauerstoff das frei diffusionsfähige Stickstoffmonoxid (NO) (Palmer u. a. 1988).

Die eNOS selbst unterliegt multiplen Stufen der posttranslationalen Modifikation und damit Aktivitätsregulation durch zahlreiche Protein-Protein-Interaktionen, einer straff organisierten mehrseitigen Phosphorylierung durch zahlreiche Phosphatasen und Kinasen, als auch einer Aktivitätsregulation durch mechanische, humorale, metabolische und pharmakologische Reize, reviewed durch (Mount u. a. 2007).

Der Aktivierung der eNOS folgend diffundiert NO zur darunterliegenden glatten Gefäßmuskulatur, wo es an Guanylylcyclasen bindet und die Bildung von cyclischem Guanosin-3',5'-Monophosphat (cGMP) auslöst (Ignarro u. a. 1987; Palmer u. a. 1987; Palmer u. a. 1988).

Über die Aktivierung cGMP-abhängiger Proteinkinasen und den Myosin-leichte-Ketten-Phosphatasen kommt es zur Vasodilatation (Moncada u. a. 1993).

Neben der Vasodilatation hemmt NO die Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten (Schäfer u. a. 2004).

Aus heutiger Sicht ist das durch die eNOS gebildete NO einer der am stärksten wirksamen Mediatoren der endothelialen Funktion (Guzik u. a. 2002). NO ist damit auch relevant für eine der wichtigsten endothelialen Funktionen – die Angiogenese. So zeigten Murohara u. a., dass die Angiogenese als Reaktion auf Hintergliedmaßenischämie bei eNOS-defizienten Mäusen vermindert war (Murohara u. a. 1998).

Zusätzlich gibt es beträchtliche Beweise, dass effektive Angiogenese die Synthese von endothelialelem NO erfordert. Zahlreiche Angiogenesefaktoren steigern die endotheliale Expression der NOS und stimulieren die Freisetzung von endothelialelem NO. Beispielsweise fördert VEGF, als einer der wichtigsten proangiogenetischen Faktoren, die endotheliale Expression der NOS und die NO-Biosynthese bei kultivierten HUVEC (van der Zee u. a. 1997; Hood u. a. 1998). Ähnlich ist es auch bei den Angiogenese-Stimulatoren transforming growth factor beta (TGFβ) oder basic fibroblast growth factor (bFGF), welche Endothelzellen ebenfalls zur Freisetzung von NO veranlassen (Inoue u. a. 1995; Wu u. a. 1996). HUVEC bildeten in

einem dreidimensionalen Gel NO und kapillarähnliche Strukturen, wenn sie durch VEGF oder bFGF stimuliert wurden (Babaei u. a. 1998; Papapetropoulos u. a. 1997).

Hinzu kommt, dass NO vielfältige Effekte auf den angiogenetischen Prozess hat: NO ist ein endothelialer Überlebensfaktor, der die Apoptose hemmt (S Dimmeler, Hermann, u. a. 1999), die endotheliale Zellproliferation erhöht (Ziche u. a. 1997) und die endotheliale Migration steigert (Ziche u. a. 1997). Zudem verbessert NO die für die Angiogenese wichtige Auflösung der extrazellulären Matrix durch eine bFGF-induzierte Hochregulation des Urokinase-Typ Plasminogen Aktivators (Ziche u. a. 1997).

Schließlich ist wichtig zu erwähnen, dass nicht nur VEGF die Freisetzung von NO fördert, sondern auch NO selbst im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus die Synthese und Freisetzung des proangiogenetischen VEGF aus vaskulären Zellen induziert (Dulak u. a. 2000). Zusammenfassend lässt sich die Wichtigkeit von NO für die endotheliale Funktion und Angiogenese hervorheben. Daher ist es nicht verwunderlich, dass multiple Mechanismen wie Abnahme der eNOS-Expression, eNOS-Entkopplung und Überproduktion von ROS, die zu einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit führen, nicht ohne Folgen für die endotheliale Funktion (T J Guzik u. a. 2002) und Angiogenese bleiben.

7.3. Pathomechanismen der Hyperglykämie induzierten endothelialen Dysfunktion – Akkumulation reaktiver Sauerstoffverbindungen

Insbesondere im Umfeld des Diabetes mellitus ist bekannt, dass Hyperglykämie den oxidativen Stress erhöht (Duckworth 2001; Powell u. a. 2001).

Hyperglykämie führt innerhalb der Atmungskette zur Akkumulation von reaktiven Sauerstoffverbindungen wie Molekülen mit ungepaarten Elektronen (Superoxidanionen, Hydroxyl-Radikale, Stickstoffmonoxid, Lipid-Radikale) und Molekülen mit stark oxidativen Eigenschaften (Wasserstoffperoxid, Peroxynitrit, hypochlorige Säure), welche endotheliale Schädigung zur Folge haben (Tesfamariam & Cohen 1992). Reaktive Sauerstoffverbindungen sind ein Nebenprodukt bei der oxidativen Phosphorylierung durch die mitochondriale Atmungskette, reviewed durch (Shen 2010). Nishikawa u. a. zeigten 2000 an bovinen Endothelzellen, dass unter Hyperglykämie der Glukoseabbau über Glykolyse und Citratzyklus erhöht ist (Nishikawa u. a. 2000). Es gibt zudem zahlreiche Enzyme, die in die ROS-Bildung involviert sind wie die NAD(P)H-Oxidase, Aldehyd-Oxidase, Xanthin-Oxidase oder Glukose-Oxidase. Eine der Hauptquellen der Superoxid-Anion-Bildung ist die NAD(P)H-abhängige Oxidase (NOX), ein Enzym aus mehreren Untereinheiten, welches durch die Reduktion von

molekularem Sauerstoff mithilfe der Elektronendonatoren NADH oder NADPH Superoxid-Anionen bildet (Paravicini & Touyz 2008).

Das Superoxid-Anion reagiert mit NO zum Peroxynitrit-Anion (ONOO⁻) (Koppenol u. a. 1992), einem reaktiven Radikal, das Lipide peroxidiert und Tyrosin-Hälften nitrosyliert und dadurch Zellmembranen, Zellsignalwege und Zellüberleben stört und insbesondere die Halbwertszeit von NO verringert (Rubanyi & Vanhoutte 1986).

Ferner oxidieren Peroxynitritanionen den aktiven eNOS-Cofaktor Tetrahydrobiopterin (BH₄) zum inaktiven Cofaktor Dihydrobiopterin (BH₂). Infolgedessen kommt es durch den BH₄-Substrat-Mangel zur funktionellen Entkopplung der eNOS, assoziiert mit einer vermehrten Produktion von Superoxiden und Peroxynitriten (Vásquez-Vivar u. a. 1998b; Kuzkaya u. a. 2003).

Zudem führt der durch Hyperglykämie verursachte oxidative Stress zu einer beeinträchtigten Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase-Aktivität (DDAH) (Lin u. a. 2002).

Das Enzym DDAH ist für den Großteil des Abbaus des Arginin-Analogons Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) verantwortlich (MacAllister u. a. 1994). ADMA konkurriert mit L-Arginin, dem eigentlichen Substrat der NO-Bildung, um die NO-Synthase (NOS). Somit fungiert ADMA als endogener Inhibitor der NO-Synthase (Vallance u. a. 1992).

Diese Beobachtungen wurden auch *in vivo* durch eine von Can u. a. 2009 durchgeführte Studie bestätigt, welche zeigen konnte, dass Patienten mit geringer Blutglukosekontrolle (HbA1c > 6,5 %) signifikant erhöhte ADMA-Konzentrationen im Vergleich zu Patienten mit strenger Blutglukosekontrolle (HbA1c ≤ 6,5 %) aufwiesen (Can u. a. 2011).

7.4. Hyperglykämie induzierte metabolische Signalwege

Diabetes-spezifische mikrovaskuläre Erkrankungen in der Retina, im Glomerulum und in den Vasa nervorum haben ähnliche pathophysiologische Eigenschaften, welche im Folgenden erläutert werden sollen.

Die Glukose wird zur Energiegewinnung der Zellen durch den biochemischen Signalweg der Glykolyse intrazellulär verstoffwechselt.

Unter normoglykämischen Bedingungen (Patienten ohne Diabetes) wird die Glukose ohne sogenannte Shuntsignalwege zunächst in Glukose-6-Phosphat und Fructose-6-Phosphat aufgespalten und in einem nächsten Schritt durch das Enzym Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) zu 1,3-Diphosphoglycerat gespalten.

Die GAPDH wird allerdings durch Hyperglykämie (unter Diabetes) bedingten Superoxidexzess gehemmt, sodass es zu einem Rückstau von Glykolysevorstufen kommt und vier große Shuntwege hochreguliert werden.

So führen erhöhte Glukosekonzentrationen zu einer Hochregulation des Polyolsignalweges und erhöhte Fructose-6-Phosphatkonzentrationen zu einer Hochregulation des Hexosaminweges. Erhöhte Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Konzentrationen erhöhen sowohl die AGE-Vorstufen als auch Diacylglycerin (DAG), welches letztendlich die Proteinkinase C aktiviert (Nishikawa u. a. 2000; Brownlee 2001).

7.4.1. Steigerung des Polyolweges

Hyperglykämiebedingte Superoxidproduktion stimuliert den Polyolweg (Nishikawa u. a. 2000). Glukose wird in einem ersten Schritt durch das NADPH-abhängige Enzym Aldosereduktase in Sorbitol umgewandelt. Dauraufhin wird Sorbitol in Fructose umgewandelt, wobei NAD^+ als Cofaktor genutzt wird. Der durch den ersten Reaktionsschritt bedingte NADPH-Verbrauch behindert wichtige NADPH-abhängige Enzyme wie die Glutationreduktase für die Reduktion von Glutathiondisulphid (GSSG) zu Glutathion (GSH). Glutathion ist eines der wichtigsten intrazellulären Antioxidantien für die Entgiftung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (Sen & Packer 1996; Powell u. a. 2001).

Das zusätzlich erhöhte $\text{NADH}:\text{NAD}^+$ -Verhältnis hemmt zusätzlich die GAPDH-Aktivität und erhöht damit die erwähnten Shuntwege (Williamson u. a. 1993).

In den eigenen Versuchen hätte zusätzlich eine Dinukleotidbestimmung im Bezug auf den intrazellulären Gehalt von NADH und NADPH sowie NAD und NADP durch chromatographische Bestimmung mittels High Performance Liquid Chromatographie (HPLC) der ethanolischen Lysate aus konfluenten HUVEC unterschiedlicher Zellkulturbedingungen durchgeführt werden können. Allerdings wurde ein Schwerpunkt auf den metabolischen Signalweg der PKC-Aktivierung gelegt, welcher im Folgenden noch erläutert wird.

7.4.2. Steigerung des Hexosaminweges

Hyperglykämie führt über Fructose-6-Phosphat zu einem erhöhten Glukosedurchsatz durch den Hexosaminweg mit einer vermehrten Bildung von Uridin-5-diphospho-N-acetylglucosamin (UDP-GlcNAc). Dies stellt das obligatorische Substrat der O-GlcNAc-Transferase (OGT) dar, welche eine reversible, posttranslationale Proteinmodifikation mittels Übertragung von O-Glc-

NAc (N-Acetyl-Glucosamin) auf spezielle Serin-/Threoninreste auf cytosolische und nukleäre Proteine katalysiert und damit die Stabilität, subzelluläre Lokalisation und Aktivität von Proteinen beeinflusst (Issad u. a. 2010).

Du u. a. konnten zeigen, dass Hyperglykämie die eNOS-Aktivität in bovinen aortalen Endothelzellen (BAEC) über eine Aktivierung des Hexosaminweges hemmt (Du u. a. 2000; Du u. a. 2001). Die eNOS wird unter anderem durch eine Phosphorylierung an Serin 1177- Enden durch die Proteinkinase Akt/PKB aktiviert (S Dimmeler, u. a. 1999). Passend dazu war die Hyperglykämie-assoziierte Hemmung der eNOS mit einem zweifachen Anstieg der O-GlcNAc-Modifikation der eNOS und umgekehrt mit einem Abfall der O-verknüpften-Serin-Phosphorylierung an 1177-Enden vergesellschaftet (Du u. a. 2000; Du u. a. 2001). Die erhöhte O-GlcNAc-Konzentration trägt zudem über eine Reduktion der Akt-vermittelten eNOS-Phosphorylierung am Serin-1177-Ende zu einer erhöhten vaskulären Reaktivität auf kontriktorische Stimuli bei (Lima u. a. 2008).

Luo u. a. untersuchten im Speziellen die Auswirkungen auf die Angiogenese und konnten zeigen, dass eine erhöhte Protein-O-GlcNAc-Modifikation über den Hexosaminweg die Angiogenese in Endothelzellen beeinträchtigt und dies mit einer Hemmung der Akt-Aktivität assoziiert ist (Luo u. a. 2008).

7.4.3. Akkumulation von AGE's (Advanced glycation end products)

Ein weiterer wichtiger Pathomechanismus bei Patienten mit Diabetes mellitus ist die Bildung von AGE's durch den Prozess der nicht-enzymatischen Glykierung (Maillard-Reaktion), bei welcher reduzierende Zucker wie Glukose nicht-enzymatisch mit Aminogruppen oder Proteinen anderer Makromoleküle reagieren. Daneben werden AGE auch aus den beschriebenen Glykolyseshunts unter Hyperglykämie gebildet: Über Glycerinaldehyd-3-Phosphat entstehen reaktive Dikarbonyle wie Methylglyoxal und Deoxyglukosone aus denen AGE werden (Brownlee u. a. 1984; Wautier & Guillausseau 1998).

Bereits 1998 zeigte Kuzuya u. a., dass strukturelle Veränderungen der Extrazellulärmatrix durch nicht-enzymatische Glykierung zu einer Beeinträchtigung der adequaten Neovaskularisation im Angiogenesemodell führen (Kuzuya u. a. 1998). Dies hätte auch in den eigenen *in vitro* Versuchen durch gezielte Inkubation des Matrigels mit Glycolaldehyd zwecks der Induzierung einer nicht-enzymatischen Glykierung unter Präsenz bzw. Abwesenheit von Aminoguanidin, einem Inhibitor der AGE- und Cross-link-Bildung, untersucht werden können.

Allerdings wurde eher ein Schwerpunkt auf den PKC-Signalweg gelegt, wie noch im Folgenden beschrieben.

Tamarat u. a. zeigten 2003 im *in vivo* Mäusemodell, dass die AGE-Bildung mit einer reduzierten Kollagenolyse und damit beeinträchtigten Angiogenese als Antwort auf Ischämie unter diabetischen Bedingungen assoziiert ist (Tamarat u. a. 2003).

Pathophysiologischer Mechanismus hinter dem durch AGE's verursachten Gewebeschaden ist die Interaktion mit ihrem Liganden Receptor of AGE's (RAGE) auf Zelloberflächen (Schmidt u. a. 1992).

Unter anderem induziert die AGE-RAGE-Interaktion die Bildung von ROS (Yan u. a. 1994) über NADPH-Oxidasen und damit einhergehende Veränderungen der Genexpression (Wautier u. a. 2001).

An kultivierten HUVEC konnten Xu u. a. zeigen, dass AGE's die eNOS-Aktivität durch verminderte Phosphorylierung an Serinen senken, assoziiert mit einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit (Xu u. a. 2003).

Zahlreiche Studien wurden mit dem löslichen RAGE-Rezeptor (sRAGE) durchgeführt, welcher eine gekürzte Variante des sich auf der Zelloberfläche befindlichen RAGE darstellt und als eine Art Köder für Liganden dient, sodass die AGE-RAGE-Bindung blockiert wird (Bucciarelli u. a. 2002).

sRAGE konnte die Entwicklung von mikrovaskulären Erkrankungen wie diabetischer Nephropathie (Wendt u. a. 2003) und Neuropathie (Bierhaus u. a. 2004), sowie makrovaskuläre Erkrankungen wie Atherosklerose (Park u. a. 1998) bei Nagetieren verhindern und auch die beeinträchtigte Wundheilung bei diabetischen Mäusen wiederherstellen (Goova u. a. 2001), sodass sich eine Schlüsselrolle von RAGE bei der Entwicklung von chronisch vaskulären Erkrankungen unter hyperglykämischen Bedingungen postulieren lässt.

Da es aber keine für das Angiogenese Assay geeigneten spezifischen RAGE-Inhibitoren gibt, konnte dieser Weg hier nicht näher untersucht werden.

7.4.4. Aktivierung des PKC-Signalweges

Dass Hyperglykämie die totalen DAG-Konzentrationen in Retina und Aorta von Hunden erhöht und dass diese DAG-Erhöhung mit einer vermehrten PKC-Aktivität in der Membranfraktion von kultivierten aortalen glatten Muskelzellen assoziiert ist, zeigten Xia u. a. bereits 1994 mit ihrer Studie (Xia u. a. 1994).

In diabetischen oder hyperglykämischen Milieu sind durch den gesteigerten Katabolismus der Glukose die Gesamtkonzentrationen von Diacylglycerin (DAG) sowohl in vaskulären Geweben wie Retina, Aorta, Herz und renalen Glomeruli (Craven u. a. 1990; Inoguchi u. a. 1992; Shiba u. a. 1993), als auch in nicht-vaskulären Geweben wie Leber und Skelettmuskel chronisch erhöht (Considine u. a. 1995; Saha u. a. 1994).

Ausgangssubstanz von DAG sind dabei die Glykolysezwischenprodukte Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Dihydroxyacetonphosphat, welche anschließend die DAG-Neusynthese erhöhen. DAG ist in der Lage die PKC, eine Serin/Threonin-zugehörige Proteinkinase mit zahlreichen endothelialen Funktionen und Involvierung in Signaltransduktionswege, zu aktivieren (Nishizuka 1988; Lee u. a. 1989).

Es existieren zahlreiche Isoformen der Proteinkinase C, welche sich in die sogenannten klassischen PKCs (α , β I/II, γ), neue PKCs (δ , ϵ , η , θ) und atypische PKCs (ζ , λ) einteilen lassen. Klassische PKCs werden durch Kalzium, Phosphatidylserin und DAG oder Phorbol ester aktiviert, neue PKCs sind Kalziumunabhängig und atypische PKCs werden durch Insulin aktiviert und sind sowohl Kalzium- als auch Phospholipidunabhängig (He & King 2005).

Doch die PKC-Isoformen können nicht nur durch DAG, sondern auch durch unter Hyperglykämie erhöhte Oxidantien wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (Konishi u. a. 1997) und mitochondriale Superoxide vermehrt aktiviert werden (Nishikawa u. a. 2000).

Wie in den eigenen Versuchen beobachtet, führt Hyperglykämie zu einer Suppression der Angiogenese.

Die genannten Studien weisen darauf hin, dass die verstärkte PKC-Aktivierung dabei eine pathophysiologisch wichtige Rolle spielen könnte.

7.4.4.1. Die Folgen der PKC-Aktivierung

Hirata u. a. zeigten 1995 an bovinen aortalen Endothelzellen (BAEC), dass die PKC-Aktivitätssteigerung die eNOS-Aktivität senkt und sich die NO-Produktion der Zellen vermindert (Hirata, 1995). Dabei führt die PKC-Aktivierung zu einer verringerten eNOS-Aktivität durch Phosphorylierung von Threonin-495 innerhalb der CaM-Bindungsdomäne (Fleming u. a. 2001) und senkt die für die vaskuläre Homöostase und Angiogenese wichtige NO-Bioverfügbarkeit (siehe Seite 60 Abschnitt: Endotheliale Dysfunktion, verminderte NO-Bioverfügbarkeit und eingeschränkte Angiogenese).

Desweiteren ist die reduzierte NO-Konzentration auch mit einer Expressionsverminderung der eNOS in kultivierten humanen koronaren Endothelzellen unter chronischer, siebentägiger Hyperglykämie assoziiert (Ding u. a. 2000).

Sehr wahrscheinlich ist auch eine Involvierung der NADPH-Oxidase, dessen gesteigerte Aktivierung mit einer erhöhten Superoxidproduktion und verminderten NO-Bioverfügbarkeit in aortalen Zellen assoziiert ist (siehe Seite 61: Pathomechanismen der Hyperglykämie induzierten endothelialen Dysfunktion – Akkumulation reaktiver Sauerstoffverbindungen).

Inoguchi u. a. zeigten an kultivierten glatten Muskelzellen (SMCs) und Endothelzellen (ECs), dass der durch den PKC-Aktivator Phorbolmyristic acid (PMA) hervorgerufene ROS-Anstieg, durch den NAD(P)H-Hemmer Diphenylene Iodonium rückgängig gemacht werden konnte, sodass sich eine PKC-abhängige Aktivierung der NADPH-Oxidase annehmen lässt. Auch die durch Hyperglykämie gesteigerte ROS-Bildung war durch den PKC-Inhibitor Bisindolylmaleid 1 (GF109203X) komplett antagonisierbar (Inoguchi u. a. 2000). Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen von Quagliaro u. a., welche beobachteten, dass die durch Hyperglykämie verursachte ROS-Überproduktion in HUVEC durch eine PKC-abhängige Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase bedingt ist und letztendlich zu einer erhöhten zellulären Apoptose führt (Quagliaro u. a. 2003).

Darüberhinaus führt die PKC-Aktivierung zu einer Veränderung der endothelialen Barrierefunktion: Bei unter Hyperglykämie kultivierten Endothelzellen wird über PKC- α -Aktivierung die endotheliale Zellpermeabilität erhöht (Hempel u. a. 1997).

Zudem führt die PKC-Aktivierung zu einer erhöhten mikrovaskulären Matrixakkumulation durch Induzierung der Expression von TGF- β 1, Fibronectin und Typ IV Kollagen in kultivierten mesangialen Zellen (Studer u. a. 1993) und in den Glomeruli von diabetischen Ratten (Koya u. a. 1997), vermittelt durch eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit und durch die PKC-Aktivierung (Craven u. a. 1997).

Desweiteren führt Hyperglykämie PKC β - und δ -Isoform vermittelt zu einer Überexpression von Endothelin-1 (ET-1) (Park u. a. 2000). Der potente Vasokonstriktor wird mit einem verminderten Blutfluss in der Retina und in peripheren Nerven bei diabetischer Retinopathie (Small u. a. 1987; Fekke u. a. 1994) und Neuropathie (Cameron u. a. 1999) in Verbindung gebracht.

Eine konkrete PKC-abhängige Suppression der Angiogenese, legten Lizotte u. a. in ihrer Studie dar: Die gesteigerte Aktivierung (Phosphorylierung) der PKC δ bei diabetischen Mäusen führte zu einer verringerten Expression der proangiogenetischen Faktoren VEGF und PDGF, mit der

Folge einer schwächeren Kapillarneubildung und Reperfusion als Antwort auf Extremitätenischämie, verglichen mit nicht-diabetischen Mäusen (Lizotte u. a. 2013).

Die unter Hyperglykämie beobachtete Suppression der Angiogenese lässt sich auch mit einer Hemmung der interzellulären Kommunikation über Gap junctions durch die PKC erklären (Inoguchi u. a. 1995). Gap junctions spielen eine zentrale Rolle bei der Angiogenese und führen bei Inhibition zu einer verringerten Zell-Zell-Kommunikation und folglich signifikant reduzierten Anzahl von Abzweigungen im HUVEC-Angiogeneseassay (Gärtner u. a. 2012).

Moriya und Ferrara konnten 2015 an HUVECs zeigen, dass unter Hyperglykämie kultivierte Endothelzellen eine erhöhte PKC- α Expression und gleichzeitig eine verminderte Expression von PDGFR- α (mRNA und Proteinkonzentrationen), Rezeptor des proangiogenetischen Faktors PDGF-C, zeigten. Die Hemmung der PKC α mit BIM 1 hingegen, hob die erniedrigte PDGFR- α Expression komplett auf und verbesserte die durch PDGF-C induzierte Angiogenese in diesen Zellen (Moriya & Ferrara 2015).

7.5. Die Effekte von Pharmaka auf die Angiogenese von unter Hyperglykämie kultivierten HUVEC – PKC-Inhibition durch BIM

Mit dem Ziel den möglichen therapeutischen Effekt einer PKC-Hemmung auf die durch Hyperglykämie supprimierte Angiogenese zu untersuchen, wurden die HUVEC's zusätzlich zu den hyperglykämischen Bedingungen mit dem PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid 1 (GF 109203X) kultiviert.

Geeignete spezifische PKC-Inhibitoren für therapeutische oder klinische Studien sollten entweder auf die regulatorische Domäne abzielen, welche mit Calcium, Phosphatidylserin und Diacylglycerol (DAG) interagiert oder an die Substrat- bzw. ATP-Bindungsstelle der katalytischen Domäne binden (Nishizuka 1988). Das verwendete Bisindolylmaleimid (GF109203X) ist ein wirkungsstarker und selektiver Inhibitor der Proteinkinase C, welcher an die ATP-Bindungsseite der katalytischen Domäne bindet. Allerdings ist Bisindolylmaleimid (GF109203X) nicht Isoform-spezifisch, sondern hemmt alle PKC-Isoformen (Toullec u. a. 1991), sodass keine Rückschlüsse auf eine Isoform-spezifische Aktivierung möglich sind.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der verwendete Proteinkinase-C-Inhibitor BIM 1 das Hyperglykämieinduzierte Angiogenesedefizit fast vollständig antagonisieren konnte.

Dies unterstützt die These von einer Involvierung der Proteinkinase C (PKC) in die unter Hyperglykämie vermehrte endotheliale Dysfunktion und damit verbundene beeinträchtigte Angiogenese, sowie die PKC-Inhibition als potentiellen therapeutischen Angriffspunkt bei diabetischen vaskulären Komplikationen.

7.6. Die PKC-Inhibition als therapeutischer Angriffspunkt

7.6.1. Der Effekt der PKC-Inhibition auf die endotheliale Funktion in Diabetesmodellen

Eine selektive Hemmung überaktivierter PKC-Isoformen unter chronischer Hyperglykämie bietet einen spezifischen therapeutischen Angriffspunkt im Bezug auf vaskuläre Komplikationen beim Diabetes mellitus.

Dabei zeigten Inoguchi u. a. 1992, dass chronische Hyperglykämie im Rattenmodell spezifisch die β_2 -Isoform der PKC im vaskulären Gewebe aktiviert (Inoguchi u. a. 1992), sodass zahlreiche Studien an Diabetesmodellen mit Ruboxistaurin (LY333531), einem β -Isoform-spezifischen PKC-Inhibitor durchgeführt wurden.

Ishii u. a. konnten dann 1996 am Diabetesmodell mit Ratten zeigen, dass oral verabreichtes Ruboxistaurin (RBX), ohne offenkundige Toxizität, einige der mit dem Diabetes mellitus assoziierten vaskulären Dysfunktionen wie der diabetischen Nephropathie und Retinopathie korrigieren kann (Ishii u. a. 1996).

Koya u. a. zeigten 2000 den Langzeiteffekt eines oralen PKC- β -Inhibitors auf die diabetische Nephropathie im Diabetes Typ 2-Mäusemodell. Die PKC- β -Inhibition reduzierte die Urin-Albuminexkretionsrate und hemmte die glomeruläre PKC-Aktivierung. Zudem zeigte sich eine Verminderung mesangialer Expansion durch eine Verhinderung der Expression von TGF- β und extrazellulärer Matrixproteine wie Fibronectin und Typ IV Kollagen (Koya u. a. 2000).

Auch Kelly u. a. zeigten 2003 den PKC- β -Hemmer RBX als möglichen therapeutischen Angriffspunkt bei diabetischer Nephropathie. Im experimentellen Diabetesmodell an Ratten, führte RBX, trotz fortbestehender Hyperglykämie und Hypertension, zu einer Reduktion der Albuminurie, strukturellen Verletzungen und TGF- β -Expression (Kelly u. a. 2003).

Auch bei der diabetischen Retinopathie erwies sich die PKC- β -Inhibition als effektiv im Bezug auf die Normalisierung einer diabetes- bzw. hyperglykämieinduzierten PKC- β -Aktivierung und assoziiertem oxidativem Stress (Abiko u. a. 2003).

7.6.2. Der Effekt der PKC-Inhibition auf die Angiogenese in Diabetesmodellen

In einem Schweinmodell mit Alloxan-induziertem Diabetes, führte die chronische Hyperglykämie zu einer signifikanten Beeinträchtigung der myokardialen angiogenetischen Antwort auf chronische Ischämie (Boodhwani u. a. 2007). Auch in einer Studie mit Streptozotocin-induziertem Diabetes bei Mäusen zeigte sich eine beeinträchtigte angiogenetische Antwort auf Ischämie, gemessen an der mikrovaskulären Dichte.

Dies konnte durch PKC- β -Inhibition rückgängig gemacht werden, assoziiert mit einer Expressionserhöhung der eNOS und des proangiogenetischen Faktors VEGF (Ikeda u. a. 2012). Die eNOS-Expressionserhöhung und damit verbundene NO-Bildung spielt eine zentrale Rolle für die NO-abhängige ischämieinduzierte Angiogenese (Luque Contreras u. a. 2006). Auch Wang u. a. zeigten 2013 an kultivierten HUVEC, dass die PKC- β -Inhibition mittels RBX die hyperglykämieinduzierte Abnahme der Tubebildung, Migration und Proliferation aufheben konnte. Die Verbesserung der unter Hyperglykämie beeinträchtigten Angiogenese durch PKC- β -Inhibition, konnte durch Wang u. a. auch in *in vivo* Versuchen bestätigt werden. Bei diabetischen Ratten erhöhte eine vierwöchige orale RBX-Therapie signifikant die kapilläre Dichte ischämischen Myokards und erhöhte zudem signifikant den Grad der phosphorylierten Akt- und phosphorylierten eNOS-Expression (Wang u. a. 2013).

Die Umkehrbarkeit der Glukose-induzierten Angiogenesehemmung in den vorliegenden Versuchen durch BIM-1 würde die These einer PKC- oder auch PKC- β -Abhängigkeit stützen und wäre konform mit den oben genannten Studien.

7.6.3. Der Effekt der PKC-Inhibition auf mikrovaskuläre Komplikationen des Diabetes in klinischen Studien

Der Erfolg von Ruboxistaurin in Studien mit Tiermodellen hat zu zahlreichen klinischen Studien geführt, zwecks einer Evaluierung der Effizienz des β_2 -Isoform-spezifischen PKC-Inhibitors im Bezug auf die diabetische Nephropathie, Retinopathie und Neuropathie.

Im Bezug auf die Sicherheit von RBX zeigen Daten aus 11 placebokontrollierten und doppelt verblindeten Studien an Diabetespatienten mit einer oralen Gabe von 32 mg RBX pro Tag für bis zu 4 Jahre eine niedrige Inzidenz von Nebenwirkungen, ein überschaubares Medikamenten-Interaktionsprofil und eine gute Toleranz und lassen somit auf eine relative Sicherheit von RBX in humanen Studien schließen (McGill u. a. 2006).

7.6.3.1. Diabetische Retinopathie

Aiello konnten 2011 durch die Datenanalyse aus zwei dreijährigen, randomisierten, placebokontrollierten, doppelt verblindeten Phase III-Studien (The PKC-DRS Study Group and The PKC-DRS Study Group 2) an 813 Patienten mit mäßig schwerer bis sehr schwerer nicht-proliferativer Retinopathie zeigen, dass eine orale RBX-Gabe von 32 mg pro Tag eine signifikante Reduktion des kontinuierlichen moderaten Visusverlust bewirkt, die

Notwendigkeit einer initialen fokalen retinalen Laserkoagulation reduziert und die Chancen für eine Sehschärfeverbesserung erhöht (Aiello u. a. 2011).

In der von Scheetz 2013 durchgeführten Analyse zweier randomisierter, placebokontrollierter, Phase III-Studien (MBDL und MBDU) zeigte die Gabe von 32 mg RBX pro Tag bei einem Minimum Follow-up von 3 Jahren keine signifikante Reduktion des kontinuierlichen, moderaten Visusverlustes bei Patienten mit diabetischer Retinopathie. Auch im Bezug auf die Progression des diabetischen Makulaödems, eine wichtige Komplikation der diabetischen Retinopathie mit durch Kapillarlecks verursachter retinaler Verdickung, zeigte sich kein einheitlicher Effekt zugunsten oder gegen RBX (Sheetz u. a. 2013).

7.6.3.2. Diabetische Nephropathie

2005 wurde von Tuttle u. a. die erste randomisierte, doppelt-verblindete, placebokontrollierte, klinische Studie mit RBX an Diabetes-Typ 2-Patienten mit diabetischer Nephropathie durchgeführt, um den Effekt einer einjährigen oralen Gabe von 32 mg RBX pro Tag auf die eGFR und die Urin-Albumin-Kreatinin-Ratio zu beurteilen. Nach einem Jahr war die Albuminurie in der RBX-Gruppe signifikant reduziert bei Aufrechterhaltung der eGFR über ein Jahr. Diese relativ kleine Pilotstudie (n = 123) erfordert allerdings weitere Studien (Tuttle u. a. 2005).

Die 2015 von Tuttle u. a. durchgeführte Post-Hoc-Analyse von Daten aus einer annähernd dreijährigen randomisierten, placebokontrollierten, klinischen Studie, welche ursprünglich den Effekt einer oraler Gabe von RBX 32 mg pro Tag auf die diabetische Neuropathie untersuchte, zeigte dass die eGFR in der Placebo-Gruppe am Studienende signifikant niedriger war als in der RBX-Gruppe. Auch diese Studie bestätigt die Hypothese, dass PKC- β -Inhibition die diabetische Nephropathie verzögern kann. Allerdings fehlt es insgesamt noch an adequat gepowerten Studien, um wirklich sicherzustellen, dass RBX das klinische Outcome bei diabetischer Nephropathie verbessert (Tuttle u. a. 2015).

7.6.3.3. Diabetische Neuropathie

Die erste randomisierte, placebokontrollierte, doppelt-verblindete, Phase II-Studie wurde 2005 von Vinik u. a. durchgeführt. In der einjährigen klinischen Studie wurden drei Versuchsgruppen etabliert: Eine RBX-Gruppe mit 32 mg pro Tag (n = 66), eine RBX-Gruppe mit 64 mg pro Tag (n = 71) und eine Placebogruppe (n = 68). Im Bezug auf den primären Endpunkt,

Veränderungen des Vibrationsdetektionsschwellenwertes (VDT), zeigte sich keine signifikante Verbesserung in beiden RBX-Gruppen im Vergleich mit der Placebogruppe. Nur in einer Subgruppe mit Patienten mit klinisch signifikanten Symptomen und weniger schwerer diabetischer peripherer Neuropathie (DPN), zeigte sich eine signifikante Verbesserung der VDT in beiden RBX-Gruppen. Im Bezug auf den sekundären Endpunkt, den Neuropathy Total Symptom Score-6 (NTSS-6) zeigte sich eine signifikante Verbesserung in der RBX-Gruppe mit 64 mg pro Tag, nicht jedoch in der RBX-Gruppe mit 32 mg pro Tag im Vergleich zur Placebogruppe (Vinik u. a. 2005).

In einer von Casellini u. a. 2007 durchgeführten 6-monatigen, randomisierten, doppelt verblindeten, placebokontrollierten Studie, zeigte sich eine signifikante Verbesserung des NTSS-Scores, der mikrovaskulären Hautdurchblutung (Skin Microvascular Blood Flow – SkBF) und einem Score für die Lebensqualität (Norfolk Quality of Life – Diabetic Neuropathy Symptom Score) in der RBX-Gruppe (32 mg pro Tag) im Vergleich zur Placebogruppe (Casellini u. a. 2007).

Brooks u. a. konnten 2008 hingegen in einer einjährigen, placebokontrollierten, randomisierten, doppelt verblindeten Studie keine Verbesserung der diabetischen Neuropathie durch 32 mg RBX pro Tag nachweisen. In der RBX-Gruppe zeigten sich weder eine Abnahme des NTSS-Scores im Sinne einer Verbesserung, noch eine Zunahme der mikrovaskulären Hautdurchblutung im Vergleich zur Placebogruppe (Brooks u. a. 2008).

7.6.4. Ein Ausblick

Die Gabe eines oralen PKC- β -Inhibitors zeigt in einigen klinischen Studien einen signifikanten Effekt auf die Progression diabetischer mikrovaskulärer Komplikationen. Allerdings sind insgesamt noch weitere ausreichend gepowerte Studien für eine sichere Schlussfolgerung von Nöten.

Im Bezug auf die eigenen Versuche und als Ausblick auf weitere Studien, wäre die Verwendung eines PKC-Isoform-selektiven und gewebespezifischen PKC-Inhibitors wie RBX essentiell, im Vergleich zum verwendeten nicht PKC-Isoform-spezifischen BIM 1. Zudem wäre die Übertragung der Ergebnisse aus dem *in vitro* Modell auf die *in vivo* Situation, insbesondere unter Betrachtung der Angiogenese, von großer Bedeutung.

7.7. Die Effekte von Pharmaka auf unter Hyperglykämie kultivierte HUVEC – Der Effekt der Behandlung mit Salbutamol

In der hier vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung von Arzneistoffen auf die Angiogenese von unter chronischer Hyperglykämie kultivierten HUVEC untersucht werden.

Es konnte gezeigt werden, dass Salbutamol einen antiangiopathischen Effekt besitzt und die endotheliale Dysfunktion im Bezug auf die Angiogenese zum Teil verhindert. Dabei wurde der antiangiogenetische Effekt der Hyperglykämie durch 20 nmol/l des β_2 -selektiven Adrenozeptor-Agonisten Salbutamol teilweise antagonisiert. Daraus lässt sich schließen, dass eine chronische β_2 -Adrenozeptor-Stimulation unter hyperglykämischen Bedingungen in der HUVEC-Zellkultur die endotheliale Funktion aufrecht erhält und Hyperglykämie-induzierte Pathomechanismen zum Teil antagonisieren kann.

Diese Versuche wurden in Anlehnung an die Versuche von Kabat 2004 durchgeführt, der bereits an PAEC eine durch Hyperglykämie verursachte endotheliale Dysfunktion, gemessen an einer Beeinträchtigung der NO-Freisetzung, zeigte. Auch hier konnte die endotheliale Dysfunktion durch selektive β_2 -Stimulation mittels Salbutamol antagonisiert werden (Kabat u. a. 2004). Die eigenen Versuche wurden im Gegensatz dazu mit Zellen menschlichen Ursprungs (HUVEC) durchgeführt und die endotheliale Dysfunktion im Bezug auf die Angiogenese untersucht.

Bereits 1997 konnte am *in vivo* Modell gezeigt werden, dass die Vasodilatation der Arteria brachialis des menschlichen Unterarms hauptsächlich durch β_2 -adrenerge Rezeptoren vermittelt wird und von der eNOS-Aktivität abhängig ist (Dawes u. a. 1997).

1999 hatten dann Olbrich u. a. gezeigt, dass die Entwicklung endothelialer Dysfunktion unter Hyperglykämie in kultivierten aortalen Endothelzellen durch Celiprolol, einem selektiven β_1 -Adrenoceptor-Antagonist mit zusätzlicher β_2 -agonistischer Aktivität (Dhein u. a. 1992), antagonisiert werden kann (Olbrich u. a. 1999).

1984 konnte erstmals die Expressierung von β -Adrenoceptoren auf bovinen, aortalen Endothelzellen mittels Radioligandenbindungsassay in Kultur nachgewiesen werden (Steinberg u. a. 1984). Kabat zeigte 2004 in seiner Arbeit das spezifische Vorhandensein von β_1 und β_2 -Adrenoceptoren auf der Zellmembran kultivierter porciner aortaler Endothelzellen. Der β_2 -Rezeptor gehört zur Gruppe der heptahelikalen (aus 7 Helices bestehenden) Rezeptoren und ist Bestandteil des sogenannten Adenylatcyclasesystems.

Durch Bindung von First messengern an ein stimulierendes heterotrimeres G-Protein (G_s), kommt es zur Aktivitätssteigerung der Adenylatcyclase, welche die Konversion von ATP zu cAMP katalysiert mit konsekutiv erhöhten cAMP-Spiegeln einhergeht (Robison u. a. 1967).

cAMP ist ein second messenger, welcher die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) auslöst, welche wiederum verschiedene Phosphorylierungskaskaden induziert wie beispielsweise die Aktivierung oder Inaktivierung verschiedener Stoffwechselenzyme oder die Transkription cAMP-abhängiger Gene im Zellkern (Comb u. a. 1986).

Selektive β_2 -Adrenozeptorstimulation kann jedoch nicht nur das stimulierende G_s -Protein, sondern auch bei lang anhaltender Stimulation das inhibitorische G_i -Protein aktivieren (Xiao u. a. 2015). Untereinheiten (β, γ) des G_i -Proteins können die PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) aktivieren, welche wiederum die Akt/PKB aktiviert (Brock u. a. 2003).

Die eNOS-Aktivität wird über zahlreiche Proteinkinasen wie Akt/PKB (Stefanie Dimmeler u. a. 1999), PKA (Queen u. a. 2006), PKC (Ingrid Fleming u. a. 2001; Matsubara 2003), cAK (AMP aktivierte Proteinkinasen) reguliert (Butt u. a. 2000).

Dass die selektive β_2 -Adrenozeptorstimulation die NO-Freisetzung in HUVEC über den cAMP/PKA-Signalweg erhöht, zeigten Ferro et al. (Ferro u. a. 1999; Ferro u. a. 2004).

Die Studien an HUVEC von Queen u. a. 2006 zeigen, dass selektive β_2 -Adrenozeptorstimulation sowohl durch die PKA, als auch durch PI3K-Akt-Signalwege einen Anstieg der Phosphorylierung von Serin-1177-Enden und somit eine Ca^{2+} -unabhängige Aktivierung der eNOS (NOS-3) verursacht. Dies steigert die NO-Biosynthese, was wiederum zu einer Hyperpolarisation der Plasmamembran mit Aktivitätserhöhung des CAT-1-Transporters führt (Queen u. a. 2006). Die Aufnahme von extrazellulären L-Arginin, als primäres Substrat der eNOS, wird somit erhöht (Hardy & May 2002). Letztendlich wird durch den Anstieg der extrazellulären L-Arginin-Aufnahme, die NO-Bildung aufrecht erhalten (Queen u. a. 2006).

In BAEC führt die PKA-induzierte Signaltransduktion zu einer Serin-1179-Phosphorylierung und über die Proteinphosphatase Typ1 (PP1) zu Threonin-497-Dephosphorylierung mit der Folge einer eNOS-Aktivitätssteigerung. Die PKC hingegen führt über die Proteinphosphatase Typ 2a (PP2A) zu einer erhöhten Phosphorylierung an Threonin-497 und erniedrigten Phosphorylierung an Serin-1179, was eine verringerte eNOS-Aktivität zur Folge hat (I Fleming u. a. 2001; Michell u. a. 2001).

Wie im Abschnitt „Aktivierung des PKC-Signalweges“ auf Seite 65 beschrieben, wird die PKC-Aktivität durch Hyperglykämie gesteigert, was letztendlich die verringerte eNOS-Aktivität unter Hyperglykämie erklären kann.

Die eigenen Ergebnisse zeigen zum einen, dass die selektive β_2 -Adrenozeptorstimulation mit Salbutamol das Angiogenesedefizit unter Hyperglykämie fast vollständig antagonisieren kann, was in Zusammenschau mit anderen Arbeiten am ehesten durch eine PKA und Akt/PKB

vermittelte eNOS-Aktivitätssteigerung bedingt ist. Zum anderen zeigen die Ergebnisse, dass auch der PKC-Inhibitor BIM 1 das durch Hyperglykämie induzierte Angiogenesedefizit in der HUVEC-Zellkultur fast vollständig antagonisieren konnte. Dies bekräftigt die Hypothese, dass die PKA und Akt/PKB eine Art Gegenspieler der PKC bezüglich der Angiogenese darstellen und dass damit sowohl PKC-Hemmung mittels BIM 1 als auch PKA- und Akt/PKB-Stimulation mittels Salbutamol das Gleichgewicht zugunsten einer eNOS-Aktivitätssteigerung verschieben und sich positiv auf die Angiogenese auswirken.

Somit sind die β_2 -Adrenozeptorstimulation und PKC-Hemmung potentielle therapeutische Angriffspunkte beim Diabetes mellitus, welche durch weitere *in vivo* Experimente untersucht werden sollten.

So konnte auch gezeigt werden, dass eine kombinierte β_1 - und β_2 -Adrenozeptorstimulation mit Isoprenalin die Angiogenese stimuliert (Dhein u. a. 2015).

Interessant wären daher Versuche, welche die Effekte einer selektiven Stimulation der Adenylatcyclase und einer selektiven Stimulation der einzelnen PKC-Isoformen auf die Angiogenese untersuchen würden, wobei dies aufgrund des Mangels an Isoform-spezifischen PKC-Aktivatoren noch nicht möglich ist.

8. Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med

Titel:

Die Auswirkungen von Hyperglykämie auf die Angiogenese am Zellkulturmodell mit humanen umbilicalen Endothelzellen.

Antagonisierung durch β_2 -Adrenozeptorstimulation und Proteinkinase C-Inhibition zur Prävention der endothelialen Dysfunktion.

Eingereicht von Johanna Katharina Hosu

Angefertigt an der Klinik für Herzchirurgie, Universität Leipzig
(Direktor: Prof. Michael A. Borger, MD PhD)

Betreut von Prof. Dr. med Stefan Dhein// Prof. Michael A. Borger, MD PhD

Juni 2018

Zahlreiche Spätkomplikationen des Diabetes mellitus sind durch endotheliale Dysfunktion im Sinne einer anormalen Angiogenese charakterisiert.

Übermäßige Angiogenese spielt eine Rolle bei diabetischer Retinopathie und Nephropathie, während gehemmte Angiogenese zu beeinträchtigter Wundheilung, verminderter koronarer Kollateralgefäßbildung als Antwort auf Ischämie, diabetischer Neuropathie, embryonalen Vaskulopathien bei Schwangerschaftskomplikationen bei maternalem Diabetes und Transplantatabstoßungsreaktionen bei Diabetespatienten führt.

In der vorliegenden Arbeit sollten die Auswirkungen chronischer Hyperglykämie auf die Angiogenese am *in vitro* Diabetesmodell untersucht werden.

Die verwendeten humanen umbilicalen venösen Endothelzellen (HUVECs) wurden dafür für 3 bis 6 Tage bis zur 80 %igen Konfluenz mit 5 mmol/l Glukose (entsprechend einer Normoglykämie) und 20 mmol/l Glukose (entsprechend einer chronischen Hyperglykämie) inkubiert.

Ein Teil der Zellen wurde zusätzlich durch 3 bis 6 tägige Inkubation mit 20 nmol/l des β_2 -selektiven Adrenozeptor-Agonisten Salbutamol oder mit 2 μ mol/l des nicht isoform-spezifischen Proteinkinase C-Inhibitors Bisindolylmaleimid 1 inkubiert, um den Effekt auf die Angiogenese zu untersuchen.

Dafür wurden die Zellen in das Angiogeneseassay gebracht und die Auswirkungen der unterschiedlichen Kulturbedingungen auf die Kapillargefäßbildung untersucht.

Dabei zeigte sich unter Hyperglykämie eine eingeschränkte Endothelfunktion im Sinne einer signifikant verminderten Angiogenese (verminderte Komplexität des gebildeten Gefäßnetzwerkes), welche durch Proteinkinase C- Inhibition mittels Bisindolylmaleimid 1 fast vollständig und durch β 2-Adrenozeptor-Stimulation mittels Salbutamol teilweise antagonisiert werden konnten.

Daraus lässt sich schließen, dass sowohl die Proteinkinase-Hemmung, als auch die β 2-Adrenozeptor-Stimulation einen therapeutischen Ansatzpunkt im Bezug auf die beeinträchtigte Angiogenese bei mikrovaskulären diabetischen Spätkomplikationen liefern könnten.

9. Literaturverzeichnis

Literaturverzeichnis Artikel

- Abaci, A. u. a., 1999. Effect of diabetes mellitus on formation of coronary collateral vessels. *Circulation*, 99(17), S.2239–2242.
- Abiko, T. u. a., 2003. Characterization of retinal leukostasis and hemodynamics in insulin resistance and diabetes: Role of oxidants and protein kinase-C activation. *Diabetes*, 52(3), S.829–837.
- Aiello, L.P. u. a., 2011. Oral protein kinase c β inhibition using ruboxistaurin: Efficacy, safety, and causes of vision loss among 813 patients (1,392 eyes) with diabetic retinopathy in the protein kinase c β inhibitor-diabetic retinopathy study and the protein kinase c β inhibit. *Retina*, 31(10), S.2084–2094.
- Aird, W.C., 2012. Endothelial cell heterogeneity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(1).
- Alberti, K.G.M.M., Zimmet, P.Z. & Ramachandran, A., 1998. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus Provisional Report of a WHO Consultation. *Who Diabetic Medicine*, 15, S.539–553.
- Almagro, S. u. a., 2010. The motor protein myosin-X transports VE-cadherin along filopodia to allow the formation of early endothelial cell-cell contacts. *Molecular and cellular biology*, 30(7), S.1703–1717.
- Armulika, A. & Betsholtz, C., 2009. Role of pericytes in vascular biology. In *Experimental Approaches to Diabetic Retinopathy*. S. 194–202.
- Arnaoutova, I. u. a., 2009. The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: State of the science and the art. *Angiogenesis*, 12(3), S.267–274.
- Arroyo, A.G. & Iruela-Arispe, M.L., 2010. Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. *Cardiovascular Research*, 86(2), S.226–235.
- Augustin, H.G. u. a., 2009. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin–Tie system. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(3), S.165–177.

- Babaei, S. u. a., 1998. Role of nitric oxide in the angiogenic response in vitro to basic fibroblast growth factor. *Circulation research*, 82(9), S.1007–1015.
- Beagley, J. u. a., 2014. Global estimates of undiagnosed diabetes in adults. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 103(2), S.150–160.
- Bentley, K. u. a., 2009. Tipping the balance: Robustness of tip cell selection, migration and fusion in angiogenesis. *PLoS Computational Biology*, 5(10).
- Bierhaus, A. u. a., 2004. Loss of pain perception in diabetes is dependent on a receptor of the immunoglobulin superfamily. *Journal of Clinical Investigation*, 114(12), S.1741–1751.
- Boodhwani, M. u. a., 2007. Functional, cellular, and molecular characterization of the angiogenic response to chronic myocardial ischemia in diabetes. *Circulation*, 116(11 Suppl), S.I31-37.
- Boussageon, R. u. a., 2011. Effect of intensive glucose lowering treatment on all cause mortality, cardiovascular death, and microvascular events in type 2 diabetes: meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ (Clinical research ed.)*, 343(jul26_1), S.d4169.
- Brock, C. u. a., 2003. Roles of G $\beta\gamma$ in membrane recruitment and activation of p110 γ /p101 phosphoinositide 3-kinase γ . *Journal of Cell Biology*, 160(1), S.89–99.
- Brooks, B. u. a., 2008. Endothelial and neural regulation of skin microvascular blood flow in patients with diabetic peripheral neuropathy: effect of treatment with the isoform-specific protein kinase C beta inhibitor, ruboxistaurin. *Journal of diabetes and its complications*, 22(2), S.88–95.
- Brown, M.D. & Hudlicka, O., 2003. Modulation of physiological angiogenesis in skeletal muscle by mechanical forces: Involvement of VEGF and metalloproteinases. *Angiogenesis*, 6(1), S.1–14.
- Brownlee, M., 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414(6865), S.813–820.
- Brownlee, M., Vlassara, H. & Cerami, A., 1984. Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Annals of Internal Medicine*, 101(4), S.527–537.

- Bucciarelli, L.G. u. a., 2002. RAGE is a multiligand receptor of the immunoglobulin superfamily: Implications for homeostasis and chronic disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(7), S.1117–1128.
- Butt, E. u. a., 2000. Endothelial nitric-oxide synthase (type III) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 275(7), S.5179–5187.
- Cameron, N.E. u. a., 1999. Protein kinase C effects on nerve function, perfusion, Na(+), K(+)-ATPase activity and glutathione content in diabetic rats. *Diabetologia*, 42, S.1120–1130.
- Can, A. u. a., 2011. Dimethylarginines in patients with type 2 diabetes mellitus: Relation with the glycaemic control. *Diabetes Res Clin Pract*, 94(3), S.e61-4.
- Casellini, C.M. u. a., 2007. A 6-month, randomized, double-masked, placebo-controlled study evaluating the effects of the protein kinase C-beta inhibitor ruboxistaurin on skin microvascular blood flow and other measures of diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes care*, 30(4), S.896–902.
- Di Cesare, M. u. a., 2016. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: A pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *The Lancet*, 387(10026), S.1377–1396.
- Chen, Q. u. a., 2012. Haemodynamics-Driven Developmental Pruning of Brain Vasculature in Zebrafish. *PLoS Biology*, 10(8).
- Claxton, S. & Fruttiger, M., 2005. Oxygen modifies artery differentiation and network morphogenesis in the retinal vasculature. *Developmental Dynamics*, 233(3), S.822–828.
- Collier, B. u. a., 2008. Glucose control and the inflammatory response. *Nutrition in clinical practice : official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*, 23(1), S.3–15.
- Comb, M. u. a., 1986. A cyclic AMP- and phorbol ester-inducible DNA element. *Nature*, 323(6086), S.353–356.
- Considine, R. V u. a., 1995. Protein kinase C is increased in the liver of humans and rats with noninsulin-dependent diabetes mellitus: an alteration not due to hyperglycemia. *Journal of Clinical Investigation*, 95(June), S.2938–2944.

- Corson, M.A. u. a., 1996. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circulation research*, 79(5), S.984–991.
- Craven, P.A. u. a., 1997. Nitric oxide inhibition of transforming growth factor-beta and collagen synthesis in mesangial cells. *Diabetes*, 46(4), S.671–681.
- Craven, P.A., Davidson, C.M. & DeRubertis, F.R., 1990. Increase in diacylglycerol mass in isolated glomeruli by glucose from de novo synthesis of glycerolipids. *Diabetes*, 39(6), S.667–674.
- Dawes, M., Chowienczyk, P.J. & Ritter, J.M., 1997. Effects of inhibition of the L-arginine/nitric oxide pathway on vasodilation caused by beta-adrenergic agonists in human forearm. *Circulation*, 95(9), S.2293–7.
- Dhein, S. u. a., 1992. Celiprolol exerts microvascular dilatation by activation of β_2 -adrenoceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 346(1), S.27–31.
- Dhein, S. u. a., 2015. Effects of isoprenaline on endothelial connexins and angiogenesis in a human endothelial cell culture system. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 388(1), S.101–108.
- Dimmeler, S. u. a., 1999. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, 399(6736), S.601–605.
- Dimmeler, S., Fleming, I., u. a., 1999. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, 399(June), S.601–605.
- Dimmeler, S., Hermann, C., u. a., 1999. Upregulation of superoxide dismutase and nitric oxide synthase mediates the apoptosis-suppressive effects of shear stress on endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19(3), S.656–64.
- Ding, Y. u. a., 2000. Effects of simulated hyperglycemia, insulin, and glucagon on endothelial nitric oxide synthase expression. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 279(1), S.E11–E17.
- Dogra, G. u. a., 2001. Endothelium-dependent and independent vasodilation studied at normoglycaemia in Type I diabetes mellitus with and without microalbuminuria. *Diabetologia*, 44(5), S.593–601.

- Du, X.-L. u. a., 2000. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(22), S.12222–12226.
- Du, X.L. u. a., 2001. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *Journal of Clinical Investigation*, 108(9), S.1341–1348.
- Du, X.L. u. a., 1998. Induction of apoptosis by high proinsulin and glucose in cultured human umbilical vein endothelial cells is mediated by reactive oxygen species. *Diabetologia*, 41(3), S.249–256.
- Duckworth, W. u. a., 2009. Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes. *The New England Journal of Medicine*, 360(2), S.129–39.
- Duckworth, W.C., 2001. Hyperglycemia and cardiovascular disease. *Current atherosclerosis reports*, 3(5), S.383–391.
- Dulak, J. u. a., 2000. Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 20(3), S.659–666.
- Feke, G.T. u. a., 1994. Retinal circulatory abnormalities in type 1 diabetes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 35(7), S.2968–2975.
- Ferrara, N., 2009. VEGF-A: A critical regulator of blood vessel growth. *European Cytokine Network*, 20(4), S.158–163.
- Ferro, A. u. a., 1999. Activation of nitric oxide synthase by β_2 -adrenoceptors in human umbilical vein endothelium *in vitro*. *British Journal of Pharmacology*, 126(8), S.1872–1880.
- Ferro, A. u. a., 2004. Nitric oxide-dependent beta2-adrenergic dilatation of rat aorta is mediated through activation of both protein kinase A and Akt. *British journal of pharmacology*, 143, S.397–403.
- Fisslthaler, B. u. a., 2000. Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. *Acta physiologica Scandinavica*, 168(1), S.81–8.

- Fleming, I. u. a., 2001. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circulation research*, 88(11), S.E68–E75.
- Forouzanfar, M.H. u. a., 2015. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks in 188 countries, 1990–2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*, 386(10010), S.2287–2323.
- Gärtner, C. u. a., 2012. Knock-down of endothelial connexins impairs angiogenesis. *Pharmacological Research*, 65(3), S.347–357.
- Gerhardt, H. u. a., 2003. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *Journal of Cell Biology*, 161(6), S.1163–1177.
- Germain, S. u. a., 2010. Hypoxia-driven angiogenesis: role of tip cells and extracellular matrix scaffolding. *Current opinion in hematology*, 17, S.245–251.
- Goova, M.T. u. a., 2001. Blockade of receptor for advanced glycation end-products restores effective wound healing in diabetic mice. *The American journal of pathology*, 159(2), S.513–25.
- Grant, D.S. u. a., 1994. The role of basement membrane in angiogenesis and tumor growth. *Pathol.Res.Pract.*, 190(9–10), S.854–863.
- Grundy, S.M. u. a., 2005. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Circulation*, 112(17), S.2735–2752.
- Guzik, T.J. u. a., 2002. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: Role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 105(14), S.1656–1662.
- Hardy, T. a & May, J.M., 2002. Coordinate regulation of L-arginine uptake and nitric oxide synthase activity in cultured endothelial cells. *Free radical biology & medicine*, 32(2), S.122–131.
- Harris, M., Eastman, R. & Cowie, C., 1993. Symptoms of sensory neuropathy in adults with NIDDM in the U.S. population. *Diabetes Care*, 16(11), S.1446–1452.
- He, Z. & King, G.L., 2005. Can protein kinase C β -selective inhibitor, ruboxistaurin, stop vascular complications in diabetic patients? *Diabetes Care*, 28(11), S.2803–2805.

- Hellström, M. u. a., 2007. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature*, 445(7129), S.776–780.
- Hempel, A. u. a., 1997. High glucose concentrations increase endothelial cell permeability via activation of protein kinase C α . *Circulation research*, 81(3), S.363–71.
- Holman, R.R. u. a., 2008. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *The New England journal of medicine*, 359(15), S.1577–89.
- Hood, J.D. u. a., 1998. VEGF upregulates ecNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *The American journal of physiology*, 274(3 Pt 2), S.H1054-8.
- Hope, B.T. u. a., 1991. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(7), S.2811–2814.
- Ignarro, L.J. u. a., 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide (endothelium-dependent relaxation/vascular smooth muscle/cyclic GMP). *Medical Sciences*, 84(December), S.9265–9269.
- Ihnat, M.A. u. a., 2007. Reactive oxygen species mediate a cellular „memory“ of high glucose stress signalling. *Diabetologia*, 50(7), S.1523–1531.
- Ikeda, A., Matsushita, S. & Sakakibara, Y., 2012. Inhibition of Protein Kinase C β Ameliorates Impaired Angiogenesis in Type I Diabetic Mice Complicating Myocardial Infarction. *Circulation Journal*, 76(4), S.943–949.
- Inoguchi, T. u. a., 2000. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*, 49, S.1939–1945.
- Inoguchi, T. u. a., 1995. Inhibition of intercellular communication via gap junction in cultured aortic endothelial cells by elevated glucose and phorbol ester. *Biochemical and biophysical research communications*, 208(2), S.492–497.
- Inoguchi, T. u. a., 1992. Preferential elevation of protein kinase C isoform β II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(22), S.11059–11063.

- Inoue, N. u. a., 1995. Molecular regulation of the bovine endothelial cell nitric oxide synthase by transforming growth factor-beta 1. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 15(8), S.1255–61.
- Irvin, M.W. u. a., 2014. Techniques and assays for the study of angiogenesis. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, S.1476–1488.
- Ishii, H. u. a., 1996. Amelioration of Vascular Dysfunctions in Diabetic Rats by an Oral PKC beta Inhibitor. *Science*, 272(5262), S.728–731.
- Issad, T., Masson, E. & Pagesy, P., 2010. O-GlcNAc modification, insulin signaling and diabetic complications. *Diabetes & metabolism*, 36(6 Pt 1), S.423–35.
- Jaffe, E.A. u. a., 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *Journal of Clinical Investigation*, 52(11), S.2745–2756.
- Jain, R.K., 2003. Molecular regulation of vessel maturation. *Nature Medicine*, 9(6), S.685–693.
- Kabat, A. u. a., 2004. Effect of a α_2 -Adrenoceptor Stimulation on Hyperglycemia- Induced Endothelial Dysfunction. , 308(2), S.564–573.
- Kabat, A. & Dhein, S., 2006. L-arginine supplementation prevents the development of endothelial dysfunction in hyperglycaemia. *Pharmacology*, 76(4), S.185–191.
- Kanai, A.J. u. a., 1995. Shear Stress Induces ATP-Independent Transient Nitric Oxide Release From Vascular Endothelial Cells, Measured Directly With a Porphyrinic Microsensor. *Circulation Research*, 77(2), S.284–293.
- Kelly, D.J. u. a., 2003. Protein kinase C beta inhibition attenuates the progression of experimental diabetic nephropathy in the presence of continued hypertension. *Diabetes*, 52(2), S.512–8.
- Ken-ichi Hirata Tsuyoshi Sakoda, Masaya Katayama, Nobutaka Inoue, Masakuni Suematsu, Seinosuke Kawashima, Mitsuhiro Yokoyama, R.K., 1995. Inhibition of Endothelial Nitric Oxide Synthase Activity by Protein Kinase C. *Hypertension*.
- Konishi, H. u. a., 1997. Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H₂O₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(21), S.11233–7.

- Koppenol, W.H. u. a., 1992. Peroxynitrite, a Cloaked Oxidant Formed by Nitric Oxide and Superoxide. *Chemical Research in Toxicology*, 5(6), S.834–842.
- Koya, D. u. a., 2000. Amelioration of accelerated diabetic mesangial expansion by treatment with a PKC beta inhibitor in diabetic db/db mice, a rodent model for type 2 diabetes. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 14(3), S.439–447.
- Koya, D. u. a., 1997. Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *The Journal of clinical investigation*, 100(1), S.115–126.
- Kuzkaya, N. u. a., 2003. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: Implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 278(25), S.22546–22554.
- Kuzuya, M. u. a., 1998. Inhibition of angiogenesis on glycated collagen lattices. *Diabetologia*, 41(5), S.491–499.
- Larson, D.M. u. a., 1997. Differential regulation of connexin43 and connexin37 in endothelial cells by cell density, growth, and TGF-beta1. *Am J Physiol*, 272(2 Pt 1), S.C405-15.
- Lee, T.S. u. a., 1989. Activation of protein kinase C by elevation of glucose concentration: proposal for a mechanism in the development of diabetic vascular complications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 86(13), S.5141–5145.
- Leslie, J.D. u. a., 2007. Endothelial signalling by the Notch ligand Delta-like 4 restricts angiogenesis. *Development*, 134(5), S.839–844.
- Lewis, J., 1998. Notch signalling and the control of cell fate choices in vertebrates. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 9(6), S.583–589.
- Ley, S.H. u. a., 2014. Prevention and management of type 2 diabetes: Dietary components and nutritional strategies. *The Lancet*, 383(9933), S.1999–2007.
- Lima, V. V. u. a., 2008. Increased vascular O-GlcNAcylation augments reactivity to constrictor stimuli - Vasoactive Peptide Symposium. *Journal of the American Society of Hypertension*, 2(6), S.410–417.

- Lin, K.Y. u. a., 2002. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: Role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation*, 106(8), S.987–992.
- Lizotte, F. u. a., 2013. PKC?? impaired vessel formation and angiogenic factor expression in diabetic ischemic limbs. *Diabetes*, 62(8), S.2948–2957.
- Luo, B., Soesanto, Y. & McClain, D.A., 2008. Protein modification by O-linked GlcNAc reduces angiogenesis by inhibiting Akt activity in endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(4), S.651–657.
- Luque Contreras, D. u. a., 2006. The role of nitric oxide in the post-ischemic revascularization process. *Pharmacology and Therapeutics*, 112(2), S.553–563.
- MacAllister, R.J. u. a., 1994. Metabolism of methylarginines by human vasculature; implications for the regulation of nitric oxide synthesis. *British journal of pharmacology*, 112(1), S.43–8.
- Malaisse-Lagae, F. u. a., 1986. Phosphorylation of 3-O-methyl-D-glucose by yeast and beef hexokinase. *FEBS Letters*, 198(2), S.292–294.
- Martin, A., Komada, M.R. & Sane, D.C., 2003. Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus. *Medicinal Research Reviews*, 23(2), S.117–145.
- Matsubara, C., 2003. of Endothelial Nitric Synthase by Protein Kinase plays key roles in many physiological processes (1-3). NO lyzes the conversion of L-arginine to L-citrulline and NO . At least three isoforms of NOS have been identified and are similar to each other and . , 133(6), S.773–781.
- Mazzone, M. u. a., 2009. Heterozygous Deficiency of PHD2 Restores Tumor Oxygenation and Inhibits Metastasis via Endothelial Normalization. *Cell*, 136(5), S.839–851.
- McGill, J.B. u. a., 2006. Clinical safety of the selective PKC-beta inhibitor, ruboxistaurin. *Expert opinion on drug safety*, 5(6), S.835–45. A
- Michell, B.J. u. a., 2001. Coordinated Control of Endothelial Nitric-oxide Synthase Phosphorylation by Protein Kinase C and the cAMP-dependent Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(21), S.17625–17628.

- Milstien, S. & Katusic, Z., 1999. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: Implications for vascular endothelial function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 263(3), S.681–684.
- Moncada, S. u. a., 1993. The L-arginine: nitric oxide pathway. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 17, S.S1–S9.
- Moriya, J. & Ferrara, N., 2015. Inhibition of protein kinase C enhances angiogenesis induced by platelet-derived growth factor C in hyperglycemic endothelial cells. *Cardiovascular Diabetology*, 14(1), S.19.
- Mount, P.F., Kemp, B.E. & Power, D.A., 2007. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 42(2), S.271–279.
- Moxey, P.W. u. a., 2011. Lower extremity amputations - a review of global variability in incidence. *Diabetic Medicine*, 28(10), S.1144–1153.
- Murohara, T. u. a., 1998. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *Journal of Clinical Investigation*, 101(11), S.2567–2578.
- Nisato, R.E. u. a., 2004. Generation and characterization of telomerase-transfected human lymphatic endothelial cells with an extended life span. *The American Journal of Pathology*, 165(1), S.11–24.
- Nishikawa, T. u. a., 2000. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*, 404(6779), S.787–790.
- Nishizuka, Y., 1988. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*, 334(6184), S.661–5.
- Obrosova, I.G., 2009. Diabetic Painful and Insensate Neuropathy: Pathogenesis and Potential Treatments. *Neurotherapeutics*, 6(4), S.638–647.
- Olbrich, A. u. a., 1999. Different effects of the β -adrenoceptor antagonists celiprolol and metoprolol on vascular structure and function in long-term type I diabetic rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 33(2).
- Palmer, R.M., Ferrige, A.G. & Moncada, S., 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327(6122), S.524–526.

- Palmer, R.M.J., Ashton, D.S. & Moncada, S., 1988. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 333(6174), S.664–666.
- Paneni, F. u. a., 2012. Gene silencing of the mitochondrial adaptor p66Shc suppresses vascular hyperglycemic memory in diabetes. *Circulation Research*, 111(3), S.278–289.
- Papapetropoulos, A. u. a., 1997. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J.Clin.Invest.*, 100(12), S.3131–3139.
- Paravicini, T.M. & Touyz, R.M., 2008. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes care*, 31 Suppl 2, S.S170-180.
- Park, J.Y. u. a., 2000. Induction of endothelin-1 expression by glucose: an effect of protein kinase C activation. *Diabetes*, 49(7), S.1239–1248.
- Park, L. u. a., 1998. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nature Medicine*, 4(9), S.1025–1031.
- Patel, A. u. a., 2008. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *The New England journal of medicine*, 358(24), S.2560–72.
- Potente, M., Gerhardt, H. & Carmeliet, P., 2011. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*, 146(6), S.873–887.
- Potenza, M.N., 2009. The importance of animal models of decision making, gambling, and related behaviors: Implications for translational research in addiction. *Neuropsychopharmacology*, 34(13), S.2623–2624.
- Powell, L. a u. a., 2001. Restoration of glutathione levels in vascular smooth muscle cells exposed to high glucose conditions. *Free radical biology & medicine*, 31(10), S.1149–1155.
- Quagliaro, L. u. a., 2003. Intermittent High Glucose Enhances Apoptosis Related to Oxidative Stress in Human Umbilical Vein Endothelial Cells: The Role of Protein Kinase C and NAD(P)H-Oxidase Activation. *Diabetes*, 52(11), S.2795–2804.
- Queen, L.R. u. a., 2006. Mechanisms underlying β_2 -adrenoceptor-mediated nitric oxide generation by human umbilical vein endothelial cells. *The Journal of Physiology*, 576(2), S.585–594.

- Reinehr, T., 2013. Type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. *World journal of diabetes*, 4(6), S.270–81.
- Ribatti, D., 2006. Genetic and epigenetic mechanisms in the early development of the vascular system. *Journal of Anatomy*, 208(2), S.139–152.
- Risau, W., 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386(6626), S.671–674.
- Robison, G.A., Butcher, R.W. & Sutherland, E.W., 1967. ADENYL CYCLASE AS AN ADRENERGIC RECEPTOR. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 139(3), S.703–723.
- Rubanyi, G.M. & Vanhoutte, P.M., 1986. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol*, 250(5 (Part 2)), S.H822–H827.
- Saha, a K. u. a., 1994. Lipid abnormalities in tissues of the KKAY mouse: effects of pioglitazone on malonyl-CoA and diacylglycerol. *The American journal of physiology*, 267(1 Pt 1), S.E95-101.
- Salameh, A. & Dhein, S., 1998. Influence of chronic exposure to high concentrations of D-glucose and long-term beta-blocker treatment on intracellular calcium concentrations of porcine aortic endothelial cells. *Diabetes*, 47(3), S.407–13.
- Sarwar, N. u. a., 2010. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: A collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *The Lancet*, 375(9733), S.2215–2222.
- Saunders, W.B. u. a., 2006. Coregulation of vascular tube stabilization by endothelial cell TIMP-2 and pericyte TIMP-3. *Journal of Cell Biology*, 175(1), S.179–191.
- Schneet, J.S. u. a., 2007. Inhibition of Dll4-mediated signaling induces proliferation of immature vessels and results in poor tissue perfusion. *Blood*, 109(11), S.4753–4760.
- Schächinger, V., Britten, M.B. & Zeiher, A.M., 2000. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation*, 101(16), S.1899–906.
- Schäfer, A. u. a., 2004. Rapid Regulation of Platelet Activation in Vivo by Nitric Oxide. *Circulation*, 109(15), S.1819–1822.

- Schmidt, A. u. a., 1992. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from lung tissue which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem*, 267(21), S.14987–14997.
- Sen, C.K. & Packer, L., 1996. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 10(7), S.709–20.
- Seuring, T., Archangelidi, O. & Suhrcke, M., 2015. The Economic Costs of Type 2 Diabetes: A Global Systematic Review. *PharmacoEconomics*, 33(8), S.811–831.
- Sheetz, M.J. u. a., 2013. The effect of the Oral PKC β inhibitor ruboxistaurin on vision loss in two phase 3 studies. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 54(3), S.1750–1757.
- Sheetz, M.J. & King, G.L., 2002. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *Journal of the American Medical Association*, 288(20), S.2579–2588.
- Shen, G.X., 2010. Oxidative stress and diabetic cardiovascular disorders: roles of mitochondria and NADPH oxidase. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 88(3), S.241–248.
- Shiba, T. u. a., 1993. Correlation of diacylglycerol level and protein kinase C activity in rat retina to retinal circulation. *Am J Physiol*, 265(5 Pt 1), S.E783-93.
- Small, K.W., Stefansson, E. & Hatchell, D.L., 1987. Retinal blood flow in normal and diabetic dogs. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 28(4), S.672–675.
- De Spiegelaere, W. u. a., 2012. Intussusceptive angiogenesis: A biologically relevant form of angiogenesis. *Journal of Vascular Research*, 49(5), S.390–404.
- Staton, C.A., Reed, M.W.R. & Brown, N.J., 2009. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *International Journal of Experimental Pathology*, 90(3), S.195–221.
- Steinberg, S.F., Jaffe, E.A. & Bilezikian, J.P., 1984. Endothelial cells contain beta adrenoceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 325(4), S.310–313.

- Studer, R.K., Craven, P.A. & DeRubertis, F.R., 1993. Role for protein kinase C in the mediation of increased fibronectin accumulation by mesangial cells grown in high-glucose medium. *Diabetes*, 42(1), S.118–126.
- Suchting, S. u. a., 2007. The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(9), S.3225–3230.
- Sundberg C u. a., 2002. Stable expression of angiopoietin-1 and other markers by cultured pericytes: phenotypic similarities to a subpopulation of cells in maturing vessels during later stages of angiogenesis in vivo. *Lab Invest*, 82(4), S.387–401.
- Suwaidi, J. a u. a., 2000. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation*, 101(9), S.948–954.
- Swift, M.R. & Weinstein, B.M., 2009. Arterial-venous specification during development. *Circulation Research*, 104(5), S.576–588.
- Tamarat, R. u. a., 2003. Blockade of advanced glycation end-product formation restores ischemia-induced angiogenesis in diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(14), S.8555–60.
- Tesfamariam, B. & Cohen, R. a, 1992. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *The American journal of physiology*, 263(2 Pt 2), S.H321–H326.
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine*, 329(14), S.977–86.
- Toullec, D. u. a., 1991. The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *The Journal of biological chemistry*, 266(24), S.15771–81.
- Tuttle, K.R. u. a., 2014. Diabetic Kidney Disease: A Report from an ADA Consensus Conference. *American Journal of Kidney Diseases*, 64(4), S.510–533.
- Tuttle, K.R. u. a., 2015. Effect of Ruboxistaurin on Albuminuria and Estimated GFR in People With Diabetic Peripheral Neuropathy : Results From a Randomized Trial. *American Journal of Kidney Diseases*, 65(4), S.634–636.

- Tuttle, K.R. u. a., 2005. The effect of ruboxistaurin on nephropathy in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 28(11), S.2686–2690.
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group, 1998. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. *Lancet*, 352(9131), S.837–853.
- Vallance, P. u. a., 1992. Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 20 Suppl 1, S.S60-2.
- Vásquez-Vivar, J. u. a., 1998a. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(16), S.9220–9225.
- Vinik, A.I. u. a., 2005. Treatment of symptomatic diabetic peripheral neuropathy with the protein kinase C beta-inhibitor ruboxistaurin mesylate during a 1-year, randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Clinical therapeutics*, 27(8), S.1164–80.
- Wang, F. u. a., 2013. Selective inhibition of PKC β 2 preserves cardiac function after myocardial infarction and is associated with improved angiogenesis of ischemic myocardium in diabetic rats. *International journal of molecular medicine*, 32(5), S.1037–1046.
- Wautier, J.L. & Guillausseau, P.J., 1998. Diabetes, advanced glycation endproducts and vascular disease. *Vascular medicine (London, England)*, 3(2), S.131–137.
- Wautier, M. u. a., 2001. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 280(5), S.E685-94.
- Wendland, E. u. a., 2012. Gestational diabetes and pregnancy outcomes - a systematic review of the World Health Organization (WHO) and the International Association of Diabetes in Pregnancy Study Groups (IADPSG) diagnostic criteria. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 12(1), S.no pagination.
- Wendt, T.M. u. a., 2003. RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *American Journal of Pathology*, 162(4), S.1123–1137.

- WHO, 2003. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. *World Health Organization technical report series*, 916, S.i–viii-1-149-backcover.
- Willi, C. u. a., 2007. CLINICIAN ' S CORNER Active Smoking and the Risk of Type 2 Diabetes. , 298(22), S.2654–2664.
- Williamson, J.R. u. a., 1993. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes*, 42(6), S.801–813.
- Witting, P.K. u. a., 2007. Hydrogen peroxide promotes endothelial dysfunction by stimulating multiple sources of superoxide anion radical production and decreasing nitric oxide bioavailability. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 20(5), S.255–268.
- World Health Organization, 2016. Global Report on Diabetes. *Isbn*, 978, S.88.
- Wu, H.M. u. a., 1996. Acidic and basic FGFs dilate arterioles of skeletal muscle through a NO-dependent mechanism. *The American journal of physiology*, 271, S.H1087–H1093.
- Xia, P. u. a., 1994. Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes*, 43(9), S.1122–1129.
- Xiao, R.P. u. a., 2015. Coupling of beta2-adrenoceptor to Gi proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes. *Circulation research*, 84(1), S.43–52.
- Xu, B. u. a., 2003. Impairment of vascular endothelial nitric oxide synthase activity by advanced glycation end products. *FASEB J*, 17, S.1289–1291.
- Yamakawa, M. u. a., 2003. Hypoxia-inducible factor-1 mediates activation of cultured vascular endothelial cells by inducing multiple angiogenic factors. *Circulation Research*, 93(7), S.664–673.
- Yan, S.D. u. a., 1994. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end-products with their receptors binding-proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 269, S.9889–9897.
- Yarom, R. u. a., 1992. Human coronary microvessels in diabetes and ischaemia. Morphometric study of autopsy material. *The Journal of Pathology*, 166(3), S.265–270.
- Yau, J.W.Y. u. a., 2012. Global Prevalence and Major Risk Factors of Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care*, 35(3), S.556–564.

- Yu, P. u. a., 2006. High D-glucose alters PI3K and Akt signaling and leads to endothelial cell migration, proliferation and angiogenesis dysfunction. *National Medical Journal of China*, 86(48), S.3425–3430.
- van der Zee, R. u. a., 1997. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation*, 95(4), S.1030–7.
- Zhou, B. u. a., 2016. Worldwide trends in diabetes since 1980: A pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *The Lancet*, 387(10027), S.1513–1530.
- Ziche, M. u. a., 1997. Nitric oxide promotes proliferation and plasminogen activator production by coronary venular endothelium through endogenous bFGF. *Circ Res*, 80(6), S.845–52.

Literaturverzeichnis Bücher

- Schmitz, S. u. a., 2011. Der Experimentator: Zellkultur, 3. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. S. 72–99

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chamber-Slide-Objektträger	36
Abbildung 2: Anordnung der Versuchsgruppen im Chamber-Slide-Objektträger	36
Abbildung 3: Punktesystem zur Auswertung der Komplexität des Kapillarnetzwerkes	39
Abbildung 4: Slide Separator	40
Abbildung 5: Konfluente HUVEC-Zellkultur mit AIF-Färbung bei 200-facher Vergrößerung (Objektivvergrößerung 20, Okularvergrößerung 10)	41
Abbildung 6: Der Effekt auf das Kapillarwachstum N, G, OK, OMD <i>in vitro</i> Angiogeneseassays	43
Abbildung 7: Einfluss auf die Zellzahl <i>in vitro</i>	44
Abbildung 8: Auswirkungen von Stoffwechseleränderungen auf die Angiogenese	45
Abbildung 9: Der Effekt auf das Kapillarwachstum N und NS <i>in vitro</i> Angiogeneseassays ..	46
Abbildung 10: Einfluss auf die Zellzahl <i>in vitro</i>	47
Abbildung 11: Der Effekt von Salbutamol auf die Angiogenese unter normoglykämischen Bedingungen	48
Abbildung 12: Der Effekt auf das Kapillarwachstum N, G, GS und G+BIM <i>in vitro</i> Angiogeneseassays	50
Abbildung 13: Einfluss auf die Zellzahl <i>in vitro</i>	51
Abbildung 14: Der Effekt von Salbutamol und Bisindolylmaleimid 1 unter hyperglykämischen Bedingungen	52
Abbildung 15: Humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC)	55

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Angiogeneseassay mit HUVEC; Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$	45
Tabelle 2: Angiogeneseassay mit HUVEC; Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$	48
Tabelle 3: Angiogeneseassay mit HUVEC; Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$	53

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

Leipzig, den 01.06.2018

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Stefan Dhein danke ich für die Übertragung des Themas der Dissertation und seine freundliche Betreuung, kompetente fachliche Beratung, stetige Erreichbarkeit, Zeit und Geduld.

Dem Klinikdirektor der Herzchirurgie am Herzzentrum Leipzig Herrn Prof. Michael A. Borger und dem ehemaligen Klinikdirektor Herrn Prof. Dr. Friedrich-Wilhelm Mohr danke ich für die Möglichkeit meine Dissertation in der Abteilung für Herzchirurgie anfertigen zu können und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und technischer Geräte im Labor.

Frau Dr. Maja-Theresa Dieterlen danke ich für ihre Ratschläge im Bezug auf die HUVEC-Zellisolation.

Frau Dr. Franziska Schlegel und Frau Michelle Halling danke ich für ihre lehrreiche Einführung und Ratschläge im Bezug auf die Zellkultur und das Angiogeneseassay.

Meinen Freunden Frau Laura Bubulyte, Herrn Jonathan Kliem und Herrn Theodoros Debebe danke ich für ihre Ratschläge im Bezug auf die Gestaltung der Dissertation.

Meinen Eltern Matthias und Barbara Mast, sowie meinem Mann Sebastian Hosu danke ich für ihre Unterstützung während des Studiums und der Dissertation.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Johanna Katharina Hosu (geb. Mast)
Geburtsdatum/ -ort: 24. Februar 1991, Berlin
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Adresse: Windthorststr. 3, 04116 Halle (Saale)
E-Mail: jo.ka.mast@web.de
Tel.: 0157-57132265

Schulische Ausbildung

23.06.2010 Abitur, Katholische Theresienschule,
Gymnasium Berlin-Weißensee

Außerschulische Ausbildung

17.09.–18.12.2005 Schulsanitäterausbildung (72 Stunden) beim
Malteser Hilfsdienst e. V. Berlin
26.–27.08. 2010 Ausbildung in Erster Hilfe

Studium

Ab 10/2010 Beginn des Medizinstudiums an der Universität Leipzig
24.08.2012 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
14.04.2016 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
02.11.2017 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen

Innere Medizin Klinik Bavaria Kreischau
Allgemeinmedizinische Praxis Dr. A. Feyer, Oschatz
Klinische Pharmakologie Herzzentrum Leipzig
Anästhesiologie St. Elisabeth-Krankenhaus, Leipzig
Pädiatrische Praxis Dr. A. Braun, Leipzig
Neurologie Klinikum St. Georg, Leipzig
Kardiologie Spitalul Județean, Satu Mare, Rumänien

Praktisches Jahr (11/2016–10/2017)

Tertial Innere Medizin St. Elisabeth-Krankenhaus Leipzig
Tertial Chirurgie Ev. Diakonissenkrankenhaus Leipzig
Tertial Anästhesiologie Universitätsklinikum Leipzig

Berufliche Tätigkeit

Ab 01.04.2018 Assistenzärztin, Krankenhaus St. Elisabeth und St. Barbara,
Halle (Saale), Innere Medizin